



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI EKSTRAK
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees)
DAN SPIRULINA (*Arthrospira platensis* Gomont) PADA
GAMBARAN HEMATOLOGI DAN APOPTOSIS SEL LIMPA
MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei* ANKA**

TESIS

**TRI WAHYUNI LESTARI
NPM: 1306433771**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL
DEPOK
JUNI 2015**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI EKSTRAK
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees)
DAN SPIRULINA (*Arthrospira platensis* Gomont) PADA
GAMBARAN HEMATOLOGI DAN APOPTOSIS SEL LIMPA
MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei* ANKA**

TESIS

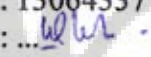
Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains

**TRI WAHYUNI LESTARI
NPM: 1306433771**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL
DEPOK
JUNI 2015**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Tri Wahyuni Lestari
NPM : 1306433771
Tanda Tangan : 
Tanggal : 28 Mei 2015

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama

: Tri Wahyuni Lestari

NPM

: 1306433771

Program Studi

: Magister Herbal

Judul Tesis

: Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Sambiloto
(*Andrographis paniculata* Nees)
dan Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont)
pada Gambaran Hematologi dan Apoptosis Sel
Limpa Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*
Anka

Pembimbing I : Prof. Dr. Berna Elya, MSi, Apt. (

)

Pembimbing II : Dr. Kusmardi, MS. (

)

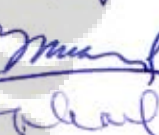
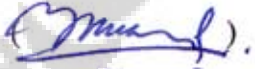
HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Tri Wahyuni Lestari
NPM : 1306433771
Program Studi : Magister Herbal
Judul Tesis : Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak
Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan
Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) pada
Gambaran Hematologi dan Apoptosis Sel Limpa
Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei* Anka

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Herbal Fakultas Farmasi.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Berna Elya, MSi, Apt. ()
Pembimbing II : Dr. Kusmardi, MS ()
Ketua sidang : Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed., Apt ()
Penguji I : Dr. Herman Suryadi, MS, Apt. ()
Penguji II : dr. Wawaimuli Arozal, M.Biomed., Pharm D ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 11 Juni 2015

KATA PENGANTAR DAN UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmatNya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Pada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak dari masa perkuliahan sampai masa penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Berna Elya, MSi, Apt., selaku pembimbing I, atas bimbingan selama penelitian dan penyusunan tesis.
2. Dr. Kusmardi, MS, selaku pembimbing II, atas bimbingan dan konsultasi teknis penelitian dan penyusunan tesis.
3. Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed., Apt, selaku ketua program studi Magister Herbal atas segala bantuan, dukungan dan perhatiannya selama menempuh studi.
4. Dr Mahdi Jufri, MSi., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi, atas kepedulian dan perhatiannya.
5. Drh. Wien Winarno, selaku kepala laboratorium Hewan Coba Balitbangkes yang telah memberikan dukungan sarana dan prasarana penelitian.
6. Seluruh Staf Laboratorium Hewan Balitbangkes yang banyak memberikan dukungan moral selama penelitian
7. Rekan-rekan S2 Herbal FFUI 2013-2015, atas kebersamaanya dalam menempuh pendidikan.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa, berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini memberi manfaat pada pengembangan ilmu.

Penulis
2015

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tri Wahyuni Lestari

NPM : 1306433771

Program Studi : S2 Herbal

Fakultas : Farmasi

Jenis karya : Tesis

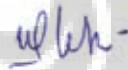
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) pada Gambaran Hematologi dan Apoptosis Sel Limpa Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei* Anka

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 28 Mei 2015
Yang menyatakan



(Tri Wahyuni Lestari)

ABSTRAK

Nama : Tri Wahyuni Lestari
Program Studi: S2 Herbal
Judul : Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) pada Gambaran Hematologi dan Apoptosis Sel Limpa Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei* Anka

Pada penelitian ini, telah diuji pengaruh pemberian kombinasi ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) terhadap persen parasitemia, persen *survival*, jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin serta persen apoptosis sel limpa pada mencit yang diinfeksi *P. berghei*. Penelitian ini dilakukan dengan rancangan acak lengkap menggunakan 75 ekor mencit strain *Swiss Webster*. Kelompok uji terdiri dari kelompok AP, AP+ES, AP+PS, CMC dan DHP. Seluruh mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* pada hari ke 0. Ekstrak bahan uji diberikan 3 hari sebelum diinfeksi (H-3) dan setiap hari selama 28 hari setelah infeksi. Data parasitemia diambil pada hari ke-3,7,10,15,21 dan 28. Sedangkan data jumlah eritrosit dan kadar Hb diambil pada hari ke 3, 10 dan 21. Pengolahan data dilakukan dengan uji Anova satu arah yang dilanjutkan dengan uji *post hoc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi powder spirulina dan ekstrak sambiloto (AP+PS) memberikan hasil yang berbeda bermakna dalam menekan persen parasitemia ($p=0,02$), meningkatkan jumlah eritrosit ($p=0,03$) dan kadar hemoglobin ($p=0,01$) pada puncak infeksi, dibanding kelompok yang diberi sambiloto saja (AP). Pemberian ekstrak sambiloto dan atau tanpa spirulina dapat menurunkan persen apoptosis sel limpa secara bermakna (AP $p= 0,001$; AP+ES $p= 0,000$; AP+PS $p= 0,000$) dibanding dengan kelompok CMC pada puncak infeksi.

Kata kunci : antimalaria, *Andrographis paniculata* Nees, apoptosis, *Arthrospira platensis* Gomont, hematologi.

xii + 100 halaman : 10 gambar; 3 tabel; 17 lampiran

Bibliografi : 52 (2000-2014)

ABSTRACT

Name : Tri Wahyuni Lestari
Program study : Magister Herbal
Title : Effect of Combination of Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) and Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) Extract in Hematology and Apoptosis of Spleen Cell in *Plasmodium berghei* Anka Infected Mice.

Effect of a combination of extracts of sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) and spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) had been investigated decrease the number of parasitemia, increase erythrocytes count, level of hemoglobin and apoptosis of spleen cell in *P. berghei* infected mice. This study was conducted by employing a complete random design using 75 Swiss Webster mice. The test group consisted of groups of AP, AP + ES, AP + PS, DHP and CMC. All mice were infected with *P. berghei* on day 0. Material test given 3 days prior to infection (D-3) and for 28 consecutives days orally after infection. Data of parasitemia, taken on D3, 10,15, 21 and 28 while erythrocytes count, and level of hemoglobin taken on D3,10 and 21. Data processed by one way Anova test followed by post hoc test. Results showed that the combination of extract of sambiloto and spirulina powder (AP + PS) was significant in suppressing the number of parasitemia ($p = 0.02$), increase of erythrocytes ($p = 0.03$) and level of hemoglobin ($p = 0.01$) in the peak of infection, compared with the group given only sambiloto (AP). Combination of sambiloto extract and or without spirulina had been significant in decrease apoptosis of spleen cell, (AP $p = 0,001$; AP+ES $p = 0,000$; AP+PS $p = 0,000$) compared with group of CMC.

Key words : antimalarial, *Andrographis paniculata* Nees, apoptosis, *Arthrospira platensis* Gomont, hematology.
xii + 100 pages : 10 pictures; 3 tables; 17 appendixes
Bibliography : 52 (2000-2014)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORSINILITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Tujuan	
1.4.1 Tujuan Umum.....	4
1.4.2 Tujuan khusus.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Etiologi dan Patogenesis Malaria.....	5
2.1.1 Etiologi malaria.....	5
2.1.2 Patogenesis malaria.....	7
2.2 Dihidroartemisinin Piperakuin.....	7
2.3 Oksigen-nitrogen reactive species (ROS) pada Malaria.....	9
2.4 <i>Plasmodium berghei</i> Anka.....	10
2.5 Anemia pada malaria.....	10
2.6 Struktur Limpa pada Infeksi Malaria.....	11
2.7 Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f) Wall.ex.Nees)	13
2.7.1 Klasifikasi tanaman.....	12
2.7.2 Morfologi Tanaman.....	13
2.7.3 Habitat.....	14
2.7.4 Kandungan kimia.....	14
2.7.5 Farmakologi.....	14
2.7.6 Toksikologi.....	15
2.7.7 Farmakokinetik.....	16
2.8 Spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>)	
2.8.1 Klasifikasi tanaman.....	17
2.8.2 Nama Umum dan Nama Daerah.....	17
2.8.3 Morfologi Tanaman	18
2.8.4 Kandungan kimia.....	18
2.8.5 Farmakologi.....	18
2.9 Kerangka teori.....	20

2.10	Kerangka konsep.....	21
III	METODOLOGI PENELITIAN	
3.1	Jenis dan desain penelitian.....	22
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.3	Bahan	22
3.4	Peralatan.....	23
3.5	Variabel.....	23
3.6	Cara Kerja	
3.6.1	Bahan uji.....	23
3.6.2	Hewan uji.....	23
3.6.3	Kriteria inklusi dan eksklusi.....	24
3.6.4	Jenis dan Jumlah Hewan Uji.....	24
3.6.5	Pemeliharaan Hewan.....	25
3.6.6	Makanan Hewan Percobaan.....	25
3.6.7	Estimasi Besar Sampel.....	25
3.7	Prosedur Kerja	
3.7.1	Pembuatan ekstrak etanol 70% <i>Andrographis paniculata</i> Lamk.....	25
3.7.2	Pembuatan ekstrak etanol 80% <i>Arthrospira platensis</i> ...	26
3.7.3	Karakterisasi ekstrak	
3.7.3.1	Penapisan fitokimia.....	26
3.7.3.2	Penetapan kadar andrografolid.....	27
3.7.3.3	Penetapan kadar flavonoid.....	28
3.7.4	Uji Antimalaria	
3.7.4.1	Pelaksanaan percobaan.....	29
3.7.4.2	Induksi <i>Plasmodium berghei</i>	30
3.7.4.3	Penetapan dosis.....	28
3.7.4.4	Perhitungan parasitemia.....	31
3.7.4.5	Analisa hematologi.....	32
3.7.4.6	Pemeriksaan apoptosis sel limpa.....	32
3.8	Analisa data.....	33
3.9	Pertimbangan etik penelitian	33
IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	34
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	44
	DAFTAR ACUAN.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Siklus transmisi malaria.....	6
Gambar 2.2	Sambiloto.....	13
Gambar 2.3	Spirulina.....	17
Gambar 2.4	Kerangka Teori.....	20
Gambar 2.5	Kerangka konsep.....	21
Gambar 4.1	Grafik survival hewan coba selama penelitian.....	37
Gambar 4.2	Grafik persen parasitemia.....	38
Gambar 4.3	Grafik jumlah eritrosit.....	40
Gambar 4.4	Grafik kadar Hb.....	40
Gambar 4.5	Grafik persen apoptosis sel limpa.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Jumlah hewan yang digunakan dalam penelitian.....	24
Tabel 4.1	Kadar zat aktif ekstrak dan powder spirulina serta ekstrak sambiloto.....	36
Tabel 4.2	Uji fitokimia ekstrak dan powder spirulina serta ekstrak sambiloto.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat lolos kaji etik.....	49
Lampiran 2	Determinasi sambiloto.....	50
Lampiran 3	Determinasi spirulina.....	51
Lampiran 4	Tabel persen parasitemia.....	53
Lampiran 5	Uji statistik persen parasitemia.....	54
Lampiran 6	Tabel jumlah eritrosit	61
Lampiran 7	Tabel kadar Hb.....	62
Lampiran 8	Uji statistik eritrosit dan kadar Hb.....	63
Lampiran 9	Tabel apoptosis.....	77
Lampiran 10	Uji statistik persen apoptosis.....	83
Lampiran 11	Gambar pewarnaan IHK hari ke 3.....	90
Lampiran 12	Gambar pewarnaan IHK hari ke 10.....	91
Lampiran 13	Gambar pewarnaan IHK hari ke 21.....	92
Lampiran 14	Perhitungan kadar andrografolid.....	93
Lampiran 15	Perhitungan kadar flavonoid.....	96
Lampiran 16	Perhitungan dosis	98
Lampiran 17	Alur kerja.....	100

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Upaya penanggulangan malaria masih menjadi target utama dalam pencapaian derajat kesehatan masyarakat yang optimal. Hal ini dikarenakan penyakit malaria masih endemis di daerah-daerah tertentu terutama di negara-negara beriklim tropis. Dalam laporan malaria dunia, menjelaskan bahwa pada tahun 2011, diperkirakan dari 104 negara endemis, 80% kematian akibat malaria hanya terjadi di 14 negara dan 80% kasus terjadi di 17 negara. (Fuadzy, H., 2013). Hasil Riskesdas 2013 Balitbangkes menyebutkan 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. Prevalensi malaria tahun 2013 adalah 6,0%. Lima provinsi dengan insiden dan prevalensi tertinggi, semuanya di Indonesia timur. Dari 33 provinsi di Indonesia, 15 provinsi mempunyai prevalensi malaria diatas angka nasional. (Balitbangkes, 2013)

Kenyataan di masyarakat menunjukkan bahwa masyarakat dapat mengatasi masalah-masalah kesehatan yang dihadapinya dengan obat-obatan yang berasal dari bahan alam. Proporsi rumah tangga di Indonesia yang menggunakan pelayanan kesehatan tradisional (Yankestrad) yaitu 30,4%. Dari 30,4% yang menggunakan Yankestrad, 49% rumah tangga menggunakan ramuan. Hal ini menunjukkan bahwa obat yang berasal dari sumber bahan alam khususnya tanaman telah memperlihatkan peranannya dalam penyelenggaraan upaya-upaya kesehatan masyarakat. (Balitbangkes, 2013, Sitorus, H., 2011)

Beberapa tanaman obat yang telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antiplasmodium, di antaranya yaitu Sambiloto (*Andrographis paniculata* L.) Ekstrak sambiloto memiliki efek antimalaria falciparum invitro dan efek maksimum pada dosis 200 µg/ml. Pengaruh ekstrak sambiloto sebagai antimalaria terdapat dalam monoterapi dan dalam kombinasi dengan klorokuin dan

artemisinin. (Zein, 2013) Hasil penelitian klinis menunjukkan bahwa efikasi antimalaria sambiloto tunggal 250, 500 mg, kombinasi sambiloto 250 mg masing-masing dengan klorokuin dan artesunat adalah 90,9; 90,5; 90,2 dan 95,2% ($p>0,3$). (Zein, 2009) Pemberian ekstrak herbal sambiloto berpengaruh meningkatkan *survival* dan keadaan umum mencit selama infeksi, namun tidak berpengaruh pada peningkatan eritrosit mencit Balb C selama perjalanan infeksi *P. berghei* Anka. (Kisdjamiatun, 2004)

Penggunaan mikronutrien yang bersifat antioksidan pada terapi obat pada mencit antimalaria memberikan hasil yang lebih baik. (Iribhogbe, et al., 2013) Antioksidan bekerja dengan menetralkan radikal bebas yang dihasilkan parasit dan sistem imun, menghambat peroksidasi membran lipid, sehingga membantu mempertahankan eritrosit yang terinfeksi (PRBC) agar tidak lisis. Dengan demikian dapat mengurangi resiko anemia pada malaria (Tjahyani, 2010).

C-fikosianin dari *Spirulina platensis* memberikan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif pada protein plasmid DNA dan membran eritrosit. Pemberian bubuk spirulina dosis 250 dan 500 mg/kgBB selama 14 hari pada tikus putih, dapat mencegah penurunan Hb, eritrosit dan leukosit tikus yang diinduksi siklofosfamid. (Dewi R.S, 2014)

Infeksi *Plasmodium* dicirikan oleh aktivasi maupun penekanan sistem imun tubuh. Adanya aktivasi sel-sel imun pada limpa menginduksi terjadinya apoptosis. (Pleonsil, P., 2013) Apoptosis atau kematian sel terprogram bertindak sebagai mekanisme kompensasi atas terjadinya aktivasi sel-sel imun untuk menjaga homeostasis respon imun. Limpa memiliki peran ganda yaitu sebagai pembersihan parasit dari sirkulasi serta peran hematopoiesis selama infeksi. Splenomegali dan perubahan yang cepat pada jumlah sel limpa dipengaruhi oleh peristiwa apoptosis. Apoptosis pada sel limpa telah terbukti meningkat seiring dengan meningkatnya parasitemia. (Kapoor, 2011) Ekstrak spirulina mengurangi secara signifikan kematian sel apoptosis yang disebabkan oleh radikal bebas. (Wan, et al, 2010)

Dengan demikian diharapkan kombinasi ekstrak sambiloto dan spirulina dapat meningkatkan *survival*, RBC, Hb, serta menurunkan apoptosis sel limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* Anka.

1.2 Rumusan Masalah.

Pemberian ekstrak herbal sambiloto berpengaruh meningkatkan *survival* dan keadaan umum mencit selama infeksi, namun tidak berpengaruh pada peningkatan eritrosit mencit Balb C selama perjalanan infeksi *P. berghei* Anka. Spirulina mengandung antioksidan yang dapat melindungi membran eritrosit, sehingga tidak terjadi hemolisis. Selain itu spirulina dapat menghambat apoptosis sel yang disebabkan oleh radikal bebas.

Pada penelitian ini diharapkan pemberian kombinasi ekstrak sambiloto dan spirulina dapat menurunkan parasitemia, meningkatkan *survival*, jumlah eritrosit dan Hb serta menurunkan apoptosis pada sel limpa mencit yang diinfeksi *P. berghei*.

1.3 Hipotesis

Kombinasi ekstrak sambiloto dan spirulina dapat menurunkan persen parasitemia, meningkatkan jumlah eritrosit dan kadar Hb serta menurunkan persen apoptosis sel limpa mencit yang diinfeksi *P. berghei*

1.4 Tujuan

1.4.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan khasiat antimalaria kombinasi ekstrak sambiloto dan spirulina dibanding dengan obat DHP.

1.4.2 Tujuan Khusus:

- a. Melakukan karakterisasi kimia ekstrak etanol sambiloto dan spirulina.
- b. Menghitung persentase parasitemia, jumlah eritrosit dan kadar Hb akibat pemberian kombinasi ekstrak sambiloto dan atau tanpa spirulina pada mencit yang diinfeksi *P. berghei* ANKA.
- c. Menghitung persentase *survival* (ketahanan hidup) mencit terinfeksi *P. berghei* ANKA yang diberi perlakuan kombinasi ekstrak sambiloto dan atau tanpa spirulina.
- d. Menilai persentase apoptosis sel limpa mencit terinfeksi *P. berghei* ANKA yang diberi perlakuan kombinasi ekstrak sambiloto dan atau tanpa spirulina.

1.5 Manfaat Penelitian

Memberikan sumbangan data ilmiah yang mendasari penggunaan herbal untuk meningkatkan efektifitas obat antimalaria yang sudah ada.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Etiologi dan Patogenesis Malaria

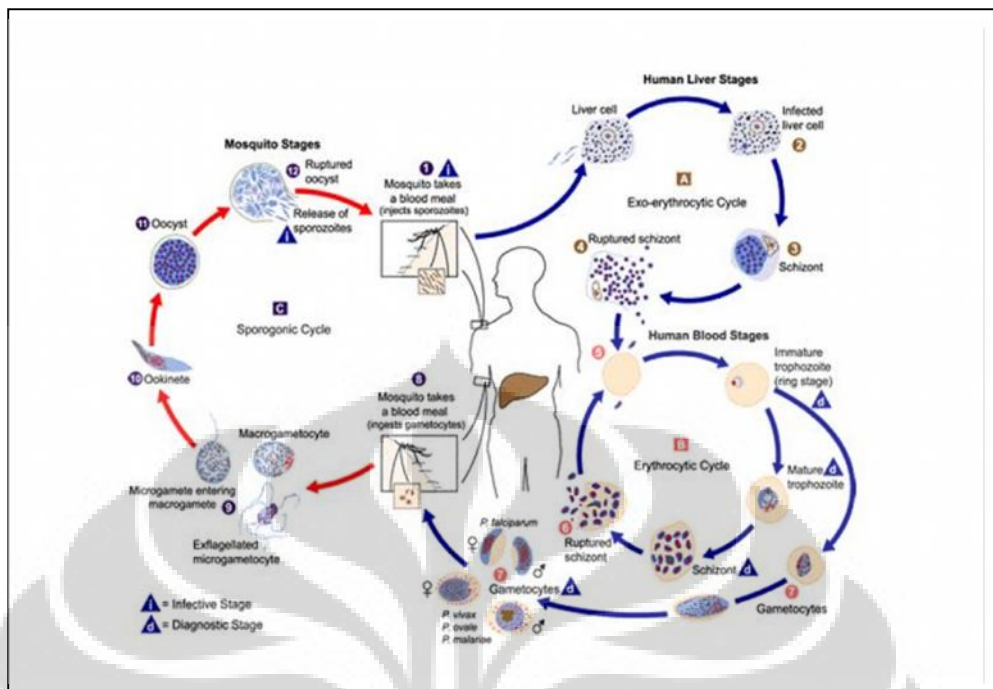
2.1.1 Etiologi Malaria

Malaria adalah penyakit menular yang disebabkan oleh parasit (protozoa) dari genus *Plasmodium*, yang dapat ditularkan melalui gigitan nyamuk anopheles. Penyebab malaria adalah *Plasmodium*; termasuk dalam famili plasmodiae. Nyamuk anopheles hidup di daerah iklim tropis dan subtropis, tetapi juga bisa hidup di daerah yang beriklim sedang. Nyamuk ini jarang ditemukan pada daerah dengan ketinggian lebih dari 2.000 – 2.500 meter. Tempat perindukannya bervariasi tergantung spesies, dan dapat dibagi menjadi tiga kawasan, yaitu pantai, pedalaman dan kaki gunung. Biasanya, nyamuk anopheles betina menggigit manusia pada malam hari atau sejak senja hingga subuh. Jarak terbangnya tidak lebih dari 0,5 – 3 km dari tempat perindukannya, kecuali jika ada tiupan angin kencang bisa terbawa sejauh 20 – 30 km. Nyamuk anopheles juga dapat terbawa mobil, pesawat terbang atau kapal laut, dan menyebarkan malaria ke daerah non-endemis. Umur nyamuk anopheles dewasa di alam bebas belum banyak diketahui, tetapi di laboratorium dapat mencapai 3 – 5 minggu.

Ada empat spesies plasmodium penyebab malaria pada manusia, yaitu :

- a. *Plasmodium vivax* menyebabkan malaria vivax/tertiana,
- b. *Plasmodium falciparum* menyebabkan malaria falciparum/tropika,
- c. *Plasmodium malariae* menyebabkan malaria malariae/quartana dan
- d. *Plasmodium ovale* menyebabkan malaria ovale.

Seorang penderita dapat dihindangi lebih dari satu jenis plasmodium. Infeksi demikian disebut infeksi campuran (*mixed infection*). Biasanya, penderita paling banyak dihindangi dua jenis parasit malaria, yakni campuran antara *P.falciparum* dan *P.vivax* atau *P.ovale*. Ciri utama genus *Plasmodium* adalah adanya dua siklus hidup, yaitu siklus hidup aseksual dan siklus seksual. (Depkes, 2008)



Sumber: www.cdc/malaria/about/biology

Gambar 2.1. Siklus transmisi malaria

2.1.1.1 Siklus hidup parasit malaria

Parasit malaria memiliki siklus hidup yang kompleks baik pada tubuh manusia dan tubuh nyamuk. Pada tubuh nyamuk *Plasmodium* bereproduksi secara seksual. Pada tubuh manusia parasit bereproduksi secara aseksual dengan cara membelah, awalnya pada sel hati dan kemudian pada eritrosit. Ketika nyamuk yang terinfeksi menggigit manusia, nyamuk memasukkan sporozoit yang terdapat dalam air liurnya ke dalam sirkulasi darah manusia. Kemudian sporozoit masuk ke dalam sel parenkhim hati dan berkembang biak membentuk skizon hati yang mengandung ribuan merozoit. Ketika skizon telah matang, skizone pecah dan melepaskan merozoit ke peredaran darah. Merozoit ini kemudian menginfeksi eritrosit dan mengonsumsi hemoglobin. Pada akhir fase terjadi sporulasi, dimana skizon hati pecah dan banyak mengeluarkan merozoit ke dalam sirkulasi darah. Pada *P.vivax* dan *P.ovale*, sebagian sporozoit membentuk hipnozoit dalam hati yang dapat bertahan sampai bertahun-tahun, atau dikenal sebagai sporozoit “tidur” yang dapat mengakibatkan relaps pada

malaria, yaitu kambuhnya penyakit setelah tampak mereda selama periode tertentu. Fase eritrosit dimulai saat merozoit dalam sirkulasi menyerang sel darah merah melalui reseptor permukaan eritrosit dan membentuk trofozoit.

Jika nyamuk anopheles betina mengisap darah manusia yang mengandung parasit malaria, parasit bentuk seksual masuk ke dalam perut nyamuk. Bentuk ini mengalami pematangan menjadi mikrogametosit dan makrogametosit, yang kemudian terjadi pembuahan membentuk zygote (ookinet). Selanjutnya, ookinet menembus dinding lambung nyamuk dan menjadi ookista. Jika ookista pecah, ribuan sporozoit dilepaskan dan bermigrasi mencapai kelenjar air liur nyamuk. Pada saat itu sporozoit siap menginfeksi jika nyamuk menggigit manusia. (U.S. Dept. of Health, 2007)

2.1.2 Patogenesis Malaria

Pada malaria dapat terjadi demam, anemia dan splenomegali. Demam mulai timbul bersamaan dan pecahnya skizon darah yang mengeluarkan bermacam-macam antigen. Antigen ini akan merangsang sel-sel makrofag, monosit atau limfosit yang mengeluarkan berbagai macam sitokin, antara lain TNF. TNF akan dibawa aliran darah ke hipotalamus yang merupakan pusat pengatur suhu tubuh dan terjadilah demam. Anemia terjadi karena pecahnya sel darah merah yang terinfeksi maupun tidak terinfeksi. *P. palcifarum* menginfeksi semua jenis eritrosit, sehingga anemia dapat terjadi pada fase akut dan kronis. *P. vivax* dan *P. ovale* hanya menginfeksi eritrosit muda, sedangkan *P. malariae* menginfeksi eritrosit tua. Dengan demikian infeksi *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae* umumnya terjadi pada keadaan kronis. Splenomegali terjadi karena adanya penambahan sel-sel radang yang menghancurkan parasit. (Depkes, 2008)

2.2 Dihidroartemisinin Piperakuin

Dihidroartemisinin+Piperakuin merupakan suatu tablet *fix dose* yang mengandung 40 mg dihidroartemisinin dan 320 mg piperakuin. Obat ini diberikan *per oral* 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 skizontosida darah. Obat ini dapat dalam bentuk formulasi atau gabungan, yang mekanisme kerjanya bebas namun target biokimianya berbeda pada parasit malaria. (Simamora D,2007)

Dehidroartemisinin (DHA) adalah metabolit akhir dari derivat artemisinin. Selain diberikan *per oral* dapat juga diberikan *per rektal*. Senyawa ini tidak larut dalam air dan memerlukan formula yang tepat untuk menjamin absorpsi yang kuat agar dicapai pengobatan yang sama dengan artesunat oral. DHA cepat diabsorpsi bila diminum oral, puncak level dicapai setelah 2,5 jam. Ikatan protein plasma sekitar 55%. Eliminasi waktu paruh 45 menit melalui usus. (Depkes, 2008)

Struktur jembatan peroksida pada molekul artemisin diputus oleh ion Fe^{2+} (ion Fe) menjadi radikal bebas yang sangat reaktif. Radikal-radikal artemisin ini kemudian menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam parasit, sehingga parasitnya mati. Seperti diketahui bahwa sumber ion Fe^{2+} intrasel adalah heme (komponen penting dalam hemoglobin). Oleh karena itu maka Fe^{2+} bertanggung jawab untuk mengaktifkan artemisin untuk membunuh parasit. Pada metabolisme parasit dalam sel darah merah, parasit memakan dan menghancurkan sampai 80% sel hemoglobin inang pada vakuola makanan. selanjutnya akan melepaskan Fe^{2+} heme, lalu teroksidasi menjadi Fe^{3+} hematin, kemudian mengendap dalam vakuola makanan membentuk kristal disebut hemozoin. Dengan demikian mekanisme artemisin dan derivatnya dilakukan oleh generasi radikal bebas dari obat-obatan tersebut dengan melalui dua tahap (i) menghasilkan radikal bebas dengan atom C di tengah. (ii) Menuju target protein yang spesifik. Target untuk artemisinin telah diketahui (PfATPase 6), namun studi sebelumnya belum menghubungkan polimorfisme gen yang mengkode enzim ini apakah dapat menurunkan kerentanannya. (Simamora D,2007)

Piperakuin adalah derivat biskuinolin yang pertama disintesa pada tahun 1960. Sejumlah penelitian di China melaporkan piperakuin lebih dapat ditoleransi dengan baik dibanding klorokuin. Obat ini merupakan campuran yang aman untuk kombinasi obat antimalarial yang mempunyai keuntungan antara lain murah, terapi

jangka pendek dengan penyembuhan yang sangat baik dan toleransi yang baik dan dapat menurunkan transmisi dan munculnya resistensi parasit. Beberapa studi melaporkan hasil efikasi kombinasi dihidroartemisinin-piperakuin memberikan rata-rata penyembuhan dalam 28 hari > 95% dan tidak berhubungan dengan sifat kardi toksik dan efek samping lain. (Depkes, 2008)

2.3 Spesies Oksigen-Nitrogen Reaktif (ROS) pada Malaria

Parasit penyebab malaria sangat rentan terhadap stres oksidatif sepanjang siklus hidupnya selama mendiami eritrosit. Selama perkembangan infeksi, parasit tersebut juga mengaktifkan makrofag, sebagai akibatnya akan dihasilkan *reactive oxygen species* (ROS). Hal ini menjelaskan adanya keterlibatan radikal bebas dalam patologi malaria. Radikal bebas dihasilkan tubuh sebagai salah satu mekanisme imunitas dalam mengeliminasi parasit. Radikal bebas juga menginduksi penghancuran eritrosit dan endotel.

Dengan demikian, radikal bebas akan merangsang terbentuknya stres oksidatif yang nantinya mampu membunuh parasit sekaligus eritrosit yang terinfeksi parasit (Tjahyani, dkk., 2010)

Superoksida, ROS, NO dan peroksinitrit dapat membunuh parasit stadium intra eritrosit. Namun demikian parasit juga melindungi dirinya dengan enzim antioksidan yang terdiri dari sistem redoks NADPH dan tioredoksin reduktase yang memegang peranan penting dalam menjaga homeostasis pada infeksi *Plasmodium*. Selain itu superoksida dan ROS juga dapat berakibat pada kerusakan makromolekul seperti lipid, protein, DNA dan enzim antioksidan. (Tripathy, S., et al., 2012)

Sumber spesies reaktif oksigen-nitrogen yang terlibat pada malaria yaitu berasal dari: (1) Respon imun dari host; (2) Reaksi Haber-Weiss dan Fenton akibat tingginya kadar Fe bebas; (3) produksi langsung dari parasit; (4) aksi dari obat antimalarial yang bersifat pro-oksidan. Dengan demikian penggunaan suplemen antioksidan mungkin efektif sebagai terapi adjuvan untuk mengurangi kerusakan pada host. (Percario, 2012)

2.4. *Plasmodium berghei* Anka

Plasmodium berghei merupakan salah satu spesies malaria yang menyerang mamalia selain manusia. Spesies ini adalah salah satu dari empat spesies yang menyerang rodensia di Afrika Barat. *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. (Kusumawardhani, D dan Widyawaruyanti, A. 2005). 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. (Tripathy, S., et al., 2012)

2.5 Anemia pada Malaria

Anemia yang disebabkan oleh malaria bukan hanya disebabkan oleh hilangnya sel darah merah yang terinfeksi parasit, namun juga karena kehilangan sel darah merah yang tak terinfeksi parasit. Anemia berat adalah suatu keadaan dimana kadar hemoglobin <5 g/dl atau hematokrit <15 % dengan parasit >100.000 / μ l. Anemia berat sering menyebabkan distress pernafasan yang dapat mengakibatkan kematian. (Depkes, 2008)

Radikal bebas dihasilkan tubuh sebagai salah satu mekanisme imunitas dalam mengeliminasi parasit. Radikal bebas juga menginduksi penghancuran eritrosit dan endotel. (Guha, M., et al. 2006) Hemolisis juga dapat terjadi karena penghancuran eritrosit terinfeksi maupun tidak terinfeksi oleh sistem retikuloendotelial limpa. Deformabilitas eritrosit yang menjadi kaku menyebabkan eritrosit tidak dapat melalui sinusoid limpa, eritrosit tidak dapat lolos dan akan difagositosis oleh makrofag. Berkurangnya deformabilitas eritrosit disebabkan oleh kegagalan pompa Na^+/K^+ , dengan akibat akumulasi ion Na^+ intraseluler. Kegagalan pompa Na^+/K^+ diduga disebabkan oleh peningkatan kadar NO yang dipicu oleh sitokin. Diseritropoiesis juga mungkin karena peranan TNF

dan IFN γ dan IL yang dapat mengganggu produksi eritrosit. (Laminkara, A., et al., 2007; Harijanto, PN., 2009)

Produk- produk *Plasmodium* seperti hemozoin (Hz), berkontribusi pada patogenesis anemia malaria. Hz yang dihasilkan dari pencernaan hemoglobin oleh parasit, menginduksi makrofag untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi dan mediator lain dengan efek penghambatan pada erythropoiesis. Hz juga langsung menghambat ekspansi progenitor erythroid dan pematangan in vitro, namun kontribusinya terhadap anemia pada orang yang terinfeksi tidak diketahui. Hz, berkontribusi terhadap penekanan eritropoiesis, rendahnya retikulositosis dan anemia pada malaria dengan menghambat proliferasi prekursor pro eritroid. (Thawani, N., et al., 2013; Harris, 2012)

2.6 Struktur Limpa pada Infeksi Malaria

Limpa adalah organ limfoid sekunder yang penting untuk imunitas dan filtrasi darah dan berguna untuk pertahanan pada infeksi malaria. Studi histopatologi pada limpa dilakukan di mencit normal dan yang terinfeksi *P. berghei*. Pada limpa yang normal pulpa merah dan pulpa putih terlihat jelas. Kapsul limpa masih utuh, berbentuk trabekular dengan arteri di dalamnya. Sel-sel retikuler, makrofag, T-sel (limfosit dan monosit) dan sel-sel plasma terdapat pada sinusoid. Pada mencit malaria umumnya ditandai dengan splenomegali. Ukuran limpa meningkat beberapa kali lipat setelah infeksi, karena masuknya limfosit dan peningkatan eritrosit di limpa. Hilangnya zona marginal terjadi seiring dengan meningkatnya parasitemia. Proliferasi di limpa terinfeksi *P. berghei* dikarenakan hiperplasia pulpa putih yang berhubungan dengan penurunan luas daerah (*periarteriolar lymphatic sheath* (PALS), sebaliknya terjadi peningkatan folikel sel-B dan daerah pusat germinal. Akumulasi pigmen hemozoin telah dilaporkan terjadi karena degradasi protein oleh parasit. Selain itu juga terjadi akumulasi haemozoin dan infiltrasi sel darah merah di ruang sinusoidal dalam limpa terinfeksi. (Kumar, V. (2014). Gambaran mikroskopik pada limpa yang terinfeksi malaria ditandai dengan kongesti dan dilatasi sinusoid limpa serta infiltrasi sel-sel mononuklear yang menggambarkan nekrosis kapiler dan pulpa pada limpa. (Ozsoy, et al, 2004)

Apoptosis merupakan proses natural yang diinduksi oleh mekanisme intraselular tanpa pengeluaran konten intraselular ke matriks ekstraseluler. Substansi toksik dari intraseluler tidak merusak lingkungan sekitar sel, tidak seperti yang terjadi pada nekrosis. (Percario, 2012) Infeksi *Plasmodium* dicirikan baik dengan aktivasi maupun supresi sistem imun. Apoptosis yang merupakan kematian terprogram bagi sel adalah mekanisme yang penting selama perkembangan, maturasi dan aktivasi limfosit. Apoptosis terlibat dalam berbagai peristiwa patologi maupun fisiologi dan menjadi mekanisme yang mengatur perkembangan dan homeostasis sistem imun. Peningkatan aktifitas apoptosis dihubungkan dengan mekanisme protektif untuk mengurangi respon inflamasi. (Kapoor, G. et al., 2011)

Parasit malaria dapat melepaskan toksin malaria, yang dapat merangsang makrofag untuk mengeluarkan TNF- α , terutama terkait dengan malaria serebral dan memainkan peran penting dalam induksi apoptosis. Perubahan yang cepat dalam populasi selular darah di limpa selama infeksi malaria *P. chabaudi* dipengaruhi oleh peristiwa apoptosis yang tampaknya, dimediasi oleh Fas. Fas (CD95), anggota dari superfamili TNFR, diakui sebagai reseptor permukaan sel utama memicu sinyal apoptosis dalam berbagai sel. Tingginya molekul massa TNF- α berkorelasi dengan peningkatan kerentanan terhadap kematian sel yang dimediasi dengan Fas dalam folikel sel tiroid, sedangkan TGF- β menghambat apoptosis yang dimediasi Fas pada berbagai tipe sel, merupakan molekul yang diketahui mengatur aktivasi caspase-8. Hasil stimulasi Fas dapat dipengaruhi oleh kombinasi sitokin tertentu seperti TNF- α dan TGF- β . Ada laporan bahwa apoptosis meningkat selama infeksi malaria pada host, yang mungkin memicu keparahan malaria. (Keswani, 2013)

2.7 Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Wall.ex.Nees)



Sumber: <http://www.phytoconcentrates.com>

Gambar 2. 2. Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Wall.ex.Nees)

2.7.1 Klasifikasi tanaman

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Sub divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Lamiales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Andrographis</i> Wall. ex Nees
Spesies	: <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees (http://www.itis.gov)

2.7.2 Morfologi Tanaman

Ciri morfologi sambiloto yaitu batangnya berkayu, berpangkal bulat, berbentuk segi empat saat muda dan bulat setelah tua, percabangan monopodial, dan berwarna hijau. Daun kecil-kecil berbentuk lanset, pangkal rata, permukaan berwarna hijau tua, tepi tidak bergerigi. Bunga berwarna putih kekuningan dan bertangkai. Buah berbentuk jorong kecil, bila tua akan pecah menjadi 4 keping.

Bunganya berwarna putih atau ungu dan berbunga sepanjang tahun. Buah yang dihasilkan berbentuk memanjang sampai jorong, sedang bijinya berbentuk gepeng. (WHO,2002)

2.7.3 Habitat

Sambiloto ialah herba tegak yang tumbuh secara alami di daerah dataran rendah hingga ketinggian sekitar 1600 dpl. Habitat sambiloto ialah di tempat terbuka seperti ladang, pinggir jalan, tebing, saluran atau sungai, semak belukar, di bawah tegakan pohon jati atau bambu. (WHO, 2002)

2.7.4 Kandungan kimia

Daun dan percabangannya mengandung lakton yang terdiri dari deoksiandrografolid, andrografolid (zat pahit), neoandrografolid, 14-deoksi-11-12-didehidroandrografolid, dan homoandrografolid. Juga terdapat flavonoid, alkane, keton, aldehyd, mineral (kalium, kalsium, natrium), asam kersik, dan damar. Flavonoid diisolasi terbanyak dari akar, yaitu polimetoksiflavin, andrografen, panikulin, mono-O-metilwithan, dan apigenin-7,4-dimetileter. Zat aktif andrografolid terbukti berkhasiat sebagai hepatoprotektor (melindungi sel hati dari zat toksik).(WHO,2002)

2.7.5 Farmakologi

Ekstrak sambiloto dosis 16,8 mg/20g BB dapat meningkatkan *survival* mencit yang diinfeksi *P. berghei*. (Djamiatun dkk, 2004 dalam Agustin Y, 2008) Ekstrak sambiloto dapat meningkatkan IFN- γ . IFN- γ merupakan salah satu sitokin yang telah dibuktikan bersifat protektif selama infeksi *P. berghei* pada mencit. Pemberian ekstrak herbal sambiloto dosis 16,08 mg/20g BB mempunyai pengaruh meningkatkan IFN- γ mencit Balb/c selama perjalanan infeksi *P. berghei* pada hari ke-3.(Agustin Y, 2008)

Ekstrak etanol 50% dari bagian aerial menghambat pertumbuhan *P. berghei* secara *in vitro* (100 mg/ml) dan pada tikus setelah pemberian intragastrik (1g/kg berat badan). Andrografolide (5mg/kg berat badan) dan neoandrografolid (2,5

mg/kg berat badan) juga efektif sebagai antimalaria bila diberikan secara oral.(WHO, 2002)

Pengaruh ekstrak sambiloto sebagai antimalaria terdapat dalam monoterapi dan dalam kombinasi dengan klorokuin dan artemisinin. (Zein, 2013) Penelitian klinis, *randomized double blind control study* terhadap sambiloto tunggal (n=40) dan sambiloto 500 mg (n=38) tiga kali sehari selama lima hari serta kombinasi sambiloto 250 mg masing-masing dengan klorokuin 1000 mg hari I dan hari II dan 500 mg hari III (n=37) dan artesunat 200 mg perhari selama 3 hari (n=40). Hasil penelitian menunjukkan bahwa efikasi antimalarial sambiloto tunggal 250 mg, 500 mg, kombinasi sambiloto 250 mg masing-masing dengan klorokuin dan artesunat adalah 90,9; 90,5; 90,2 dan 95,2% ($p>0,3$). (Zein, 2009)

Diterpen lakton andrografolida dan neoandrografolid yang diisolasi sebagai komponen aktif dari ekstrak dapat menekan produksi NO dengan cara yang tergantung konsentrasi, dalam kisaran konsentrasi 0,1-100 pM dan nilai-nilai IC_{50} masing-masing 7,9 dan 35,5 pM. Neoandrografolid juga menekan produksi NO oleh 35 dan 40% makrofag setelah pemberian oral neoandrografolide pada dosis 5 dan 25 mg/kg/hari dan LPS. Namun, andrografolid tidak mengurangi produksi NO pada pemberian oral dengan dosis yang sama. Hasil ini menunjukkan bahwa neoandrografolid, yang menghambat produksi NO secara *in vitro* dan *ex vivo* berperan penting dalam penggunaan *A. paniculata* sebagai simplisia anti-inflamasi. Efek antiinflamasi andrografolid juga terdapat pada hambatan adesi endotel pada monosit yang diinduksi TNF tergantung konsentrasi. Andrografolid menekan apoptosis jalur mitokondria dengan menghambat pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma, sebagai akibatnya, mencegah aktivasi caspase-3 dan 9.(EMA, 2010)

2.7.6 Toksikologi

Uji toksisitas akut ekstrak sambiloto merek KalmCold, pada dosis 5000 mg/kg tidak memperlihatkan efek samping yang berarti selama 14 hari pengamatan. Ekstrak sambiloto termasuk bahan yang aman dengan toksisitas akut (LD_{50}) sebesar 17 g/kg berat badan. (EMA, 2013) Uji toksisitas subkronik selama 60 hari

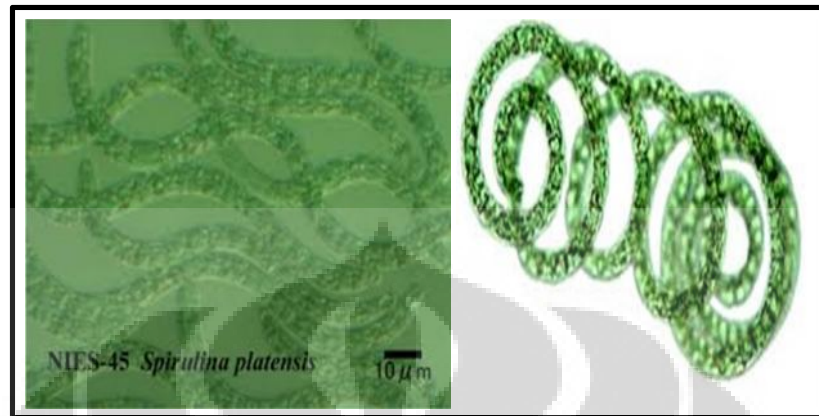
terhadap testis tikus putih yang diberi ekstrak *Andrographis paniculata* dengan dosis 20, 200 dan 1000 mg/kg tidak menunjukkan terdapat kelainan pada sel leydig dan kadar testosterone tikus jantan. Uji teratogenik ekstrak daun sambiloto dosis ekstrak yaitu 0 (kontrol); 0,004 (1 x dosis manusia); 7,5; 15; dan 22,5 g/g bb/ hari, yang diberikan pada induk selama masa organogenesis menyebabkan kelainan morfologi fetus berupa kerdil, hemoragi dan cacat kaki bengkok, seiring peningkatan dosis perlakuan. (Setyawati, I., 2009).

2.7.7 Farmakokinetik

Penentuan kandungan andrografolid (AP) dan 14-deoxy-11,12didehydroandrografolid (DIAP) pada plasma tikus setelah pemberian oral ekstrak metanol daun sambiloto dengan dosis 1 g/kg BB, dilakukan dengan HPLC. Peningkatan konsentrasi plasma AP dan DIAP diobservasi dari 30 menit hingga 3 jam setelah pemberian ekstrak. Konsentrasi maksimum AP dan DIAP dalam plasma yaitu $1.42 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ dan $1.31 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ (Akowuah et al., 2009).

Studi farmakokinetik dengan menggunakan metode HPLC, untuk mengevaluasi kadar andrografolid (AND) dalam plasma tikus setelah pemberian secara oral ekstrak *Andrographis paniculata* (APE). AND diserap secara cepat dan hampir 91% berada di dalam darah tikus setelah pemberian oral APE dengan dosis 20 mg/kg BB. Bioavailabilitasnya menurun 4x lipat jika dosis dinaikkan menjadi 10x lipat. Meningkatnya dosis hingga 200 mg/kg BB tidak meningkatkan konsentrasi AND dalam darah tikus. Kurang dari 10% AND diekskresikan lewat urin, mengindikasikan ekskresi lewat ginjal bukan satu-satunya jalan eliminasi AND. (Panoscian et al., 2000).

2.8 Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont)



Sumber: www.herbwisdom.com

Gambar 2.3. Spirulina (*Arthrospira platensis*.)

2.8.1 Klasifikasi

Kingdom	:	Eubacteria
Filum	:	Cyanobacteria
Kelas	:	Cyanophyceae
Ordo	:	Oscillatoriales
Famili	:	Spirulinaceae
Genus	:	Spirulina
Spesies	:	<i>Arthrospira platensis</i> (Nordstedt) Gomont
Sinonom	:	<i>Spirulina platensis</i> (Nordstedt) Gomont

2.8.2 Morfologi

Spirulina (*Arthrospira platensis*) adalah ganggang bersel tunggal yang termasuk dalam Cyanobacteria. Kapasitas sel untuk berproliferasi dan kecenderungan untuk berikatan dalam koloni menyebabkan spirulina menjadi massa tumbuhan yang besar dan mudah bergabung. Dahulu genus ini bernama spirulina, namun kesepakatan sekarang menyebut genus ini *Arthrospira*. *Arthrospira platensis* memiliki pigmen klorofil (hijau) dan fikosianin (biru) dalam struktur selulernya. Secara alamiah terdapat pada danau-danau di daerah tropis dan sub tropis dengan konsentrasi bikarbonat yang tinggi. Dengan demikian *Arthrospira platensis* tumbuh subur pada air hangat dengan pH agak basa. *Arthrospira platensis* banyak terdapat di Afrika, Asia dan Amerika. (Wulandari,A.F.S,2010)

2.8.3 Kandungan kimia

C-fikosianin dalam *Arthrospira platensis* adalah antioksidan alami atau primer dari kelompok fitokimia, golongan flavonoid dan larut dalam air. Struktur kimia pada c-fikosianin, dapat menghilangkan radikal peroksida dengan menambahkan satu atom hidrogen. Kemampuan menghambat radikal hidroksil tergantung dari kadar fikosianin. (Dewi R.S, 2014)

Spirulina termasuk dalam sianobakteri yang berukuran mikroskopis dan berbentuk filamen serta memiliki kandungan protein tinggi (50-70%), vitamin B12, vitamin A (beta karoten), dan mineral terutama zat besi. (Murtini, J.T. 2010) Flavonoid dan senyawa fenolik memberikan aktifitas antioksidan pada spirulina. (Salamatullah, A., 2014)

2.8.4 Farmakologi

Uji toksisitas sub-kronik *Spirulina platensis* pada mencit jantan galur DDY, umur 2-3 bulan dengan bobot 20–30 g/ekor. Pemberian bahan uji (bubuk spirulina kering disuspensikan dalam larutan 0,5% CMC-Na) dilakukan secara oral selama 4 minggu, selanjutnya dilakukan masa pemulihan selama 2 minggu dan setiap 2 minggu dilakukan pengambilan darah dan organ (hati, ginjal, dan lambung). Berdasarkan hasil pengamatan terhadap nilai rata-rata kandungan GOT, GPT, kreatinin, dan albumin, yang ditunjukkan setelah pemberian *Spirulina*

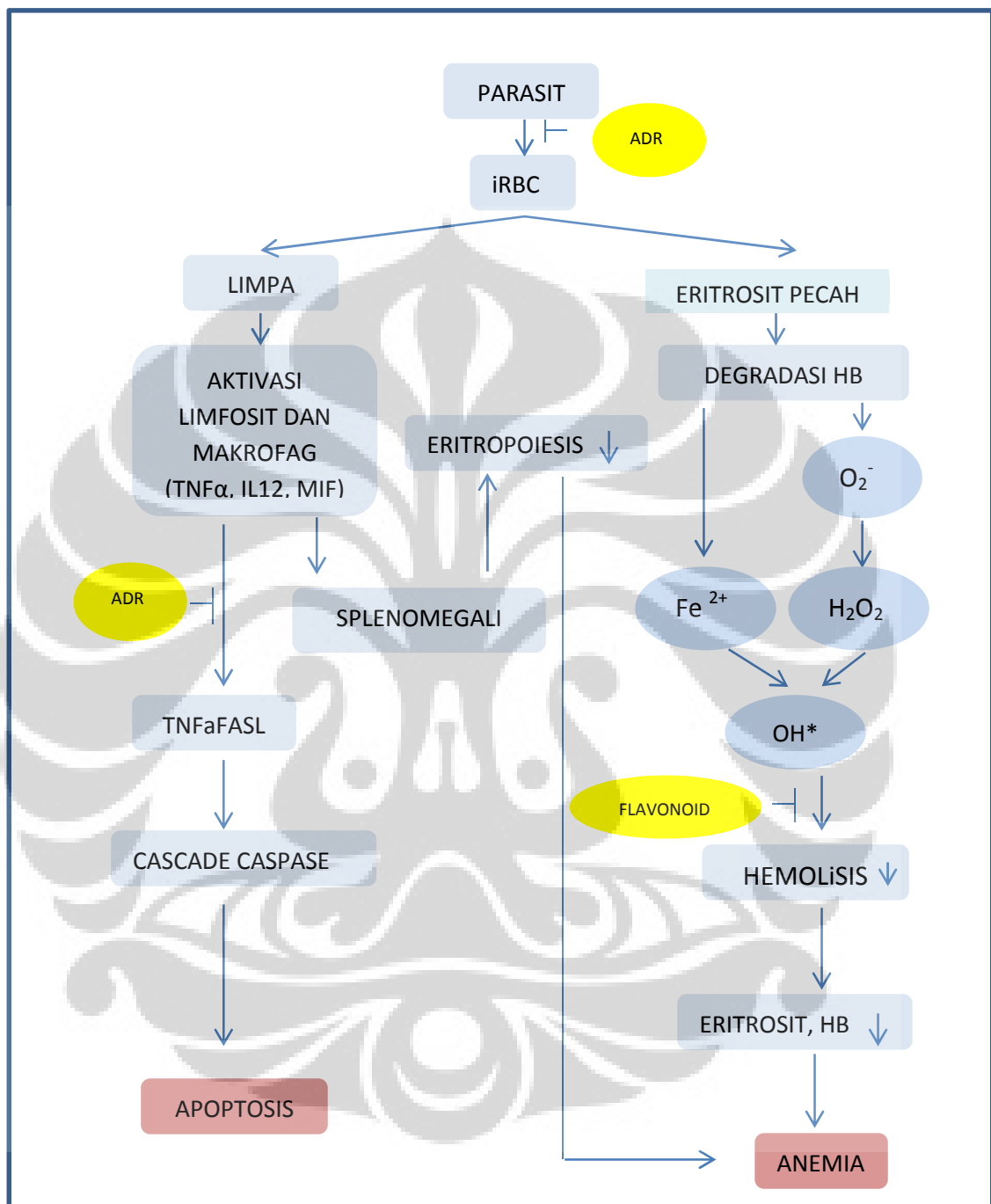
platensis sampai dengan dosis 10,4 mg/20 g bobot badan mencit (setara dengan 4 g/70 kg berat badan manusia) secara keseluruhan masih dalam rentang nilai normal. Hasil pengamatan secara histopatologis menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol dan dosis (2,6 mg spirulina/20 g bb mencit) tidak terjadi kerusakan yang berat pada organ hati dan ginjal, sedangkan perlakuan dosis 5,2 dan 10,4 mg spirulina/ 20 g bb mencit memberikan kerusakan ringan pada organ hati dan ginjal yang ditandai dengan adanya degenerasi sel hati (organ hati); nekrosis pada sel tubulus, dan adanya endapan protein pada glomerulus (organ ginjal). Kerusakan ringan pada hati ternyata dapat pulih kembali setelah masa pemulihan. Pada organ lambung, pemberian *S. platensis* sampai dengan dosis 10,4 mg/20 g bobot badan mencit ternyata tidak memberikan kerusakan buluh darah lambung. (Murtini, J.T. 2010)

Ekstrak spirulina mengurangi secara signifikan kematian sel apoptosis ($p < 0,05$) karena difenilpicrilhidrazil (DPPH), 4 sampai 5 kali lipat meskipun aktivitas itu kurang dari vitamin C. Berdasarkan uji DPPH, aktivitas radikal ekstrak spirulina lebih tinggi dari fikosianin dan 50% lebih kecil dari vitamin C dan vitamin E. (Wan, et al, 2010)

C-fikosianin (c-PC) dari *Spirulina platensis* memberikan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif pada protein plasmid DNA dan membran eritrosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa c-PC dapat mengurangi persentase kerusakan DNA yang disebabkan oleh reaksi Fenton seiring dengan kenaikan dosis. c-PC juga memiliki efek perlindungan pada protein membran eritrosit. Seperti yang ditunjukkan oleh analisis SDS-PAGE membran sel darah merah, c-PC dapat mencegah degradasi kerangka sel darah merah setelah terpapar hidrogen peroksida. Kedua percobaan menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan c-PC lebih tinggi dari trolox pada konsentrasi yang sama. Hasil penelitian menunjukkan bahwa c-phycocyanin diharapkan menjadi pendekatan terapi baru untuk penyakit yang dimediasi stres oksidatif. (Pleonsil, P., 2013)

Pemberian bubuk spirulina dosis 250 dan 500 mg/kgBB selama 14 hari pada tikus putih, dapat mencegah penurunan Hb, eritrosit dan leukosit tikus yang diinduksi siklofosamid. (Dewi, R.S, 2014)

2.9. Kerangka Teori

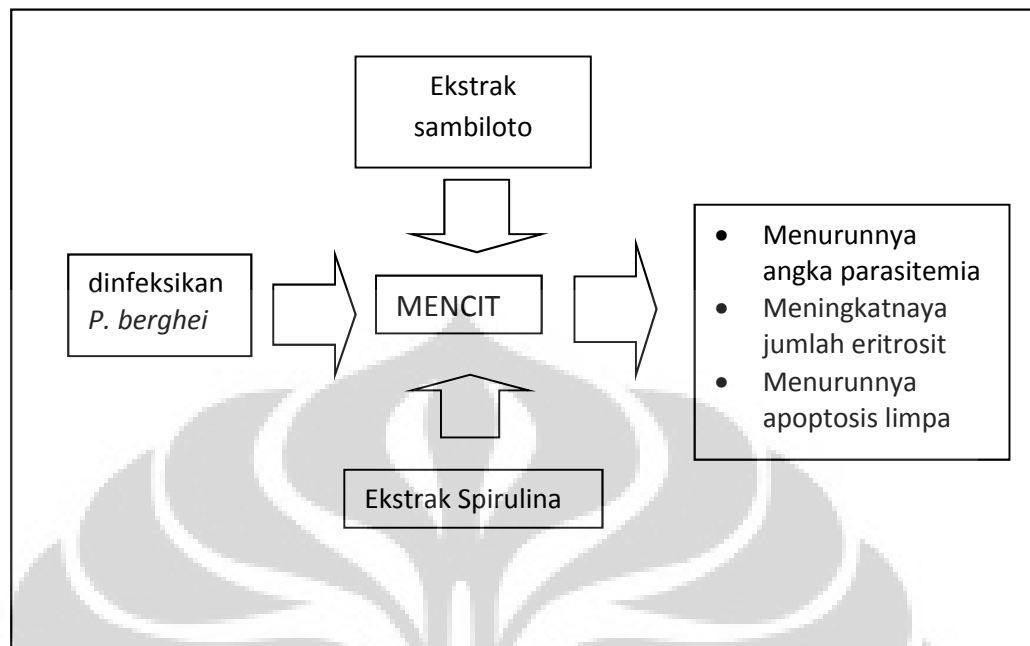


KET: ADR=andrografolid

— = menghambat

Gambar 2.4 Kerangka teori

2.10 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Desain penelitian adalah eksploratif, dengan rancangan acak lengkap (RAL).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes, Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran IPB serta Laboratorium Fitokimia, Pusat Studi Biofarmaka-IPB, selama bulan Januari 2015 sampai dengan Mei 2015.

3.3 Bahan

Ekstrak etanol 70% sambiloto, ekstrak etanol 80% spirulina, tablet dehidroartemisinin piperakin (DHP) dan CMC. Parasit uji menggunakan biakan *Plasmodium berghei* strain ANKA yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi, Balitbangkes. Hewan coba menggunakan mencit jantan strain *Swiss Webster*. Ketamine, silazin, formalin, buffer sitrat, etanol 70%, minyak imersi, PBS, RPMI, EDTA. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi poliklonal caspase-3 (rabbit polyclonal anti-mouse caspase-3, (Abcam), polymer HRP yang dikonjugasikan dengan antibody sekunder (The Envision+Dual Link System-HRP (Dako) serta kromogen DAB (Dako). Set reagen *hematology analyzer*.

Bahan untuk karakterisasi ekstrak: alkohol 95% (Merck), akuades, methanol (Merck), asam klorida (Merck), asam asetat (Merck), asam sulfat pekat (Merck), kloroform (Merck), etil asetat (Merck), toluene (Merck), heksan, vanillin sulfat (Merck), ammonium sulfat (Merck), asam indigo sulfat (Merck), baku pembanding kuercetin (Sigma) dan andrografolid (Sigma).

3.4. Peralatan

Alat-alat yang digunakan yaitu: kandang mencit, timbangan hewan (Compact balance), timbangan analitik (Mettler toledo), mikroskop cahaya (Nikkon), glass objek, peralatan gelas, rotary evaporator (Buchi), seperangkat alat bedah (Esculap), sonde lambung (Kent scientific), microtube, seperangkat alat histopatologi dan *Hematologi analyzer* (Nihon Kohden), HPLC (Shimadzu LC2010 CHT), Spektrofotometer (Hitachi U 2000).

3.5 Variabel

a. variabel tergantung adalah persen parasitemia, persen *survival*, jumlah eritrosit, kadar Hb serta persen apoptosis.

b. variabel bebas adalah perlakuan

3.6 Cara Kerja

3.6.1. Bahan uji

Bahan uji yaitu herba sambiloto yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Sambiloto dipanen saat berumur 3-4 bulan pada saat tanaman mulai berbunga.

Bahan uji spirulina yang digunakan berupa powder produksi dari PT. Trans Pangan Spirulindo yang merupakan hasil budidaya asli dari Teluk Awur, Jepara, Jawa Tengah.

3.6.2 Hewan uji

Hewan coba mencit yang 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 antimalaria).

Sebelum digunakan untuk penelitian, mencit diberi obat cacing (anthelmintik) sejak berumur 6 minggu. Setelah itu mencit dikelompokkan, dan

dikarantina terlebih dahulu setidaknya selama 7 hari. Mencit dipelihara dalam kandang *fiber glass* dengan tutup *stainless steel* serta diberi pakan pelet dan air minum secukupnya.

3.6.3 Kriteria inklusi dan eksklusi

3.6.3.1 Kriteria inklusi:

- a. Mencit strain Swiss Webster
- b. Mencit berjenis kelamin jantan
- c. Mencit berumur 8-10 minggu
- d. Mencit memiliki berat 24-28 gram dan seragam
- e. Sudah diberi obat cacing
- f. Sudah terinfeksi *Plasmodium berghei*

3.6.3.2 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).

3.6.4 Jenis dan jumlah hewan uji

Penelitian ini menggunakan hewan percobaan mencit Swiss Webster, jantan umur 8-10 minggu, berat 24-28 gram

Tabel 3.1 Jumlah hewan yang digunakan dalam penelitian

Uji	Jml kelompok	N	Jumlah mencit
Uji antimalarial seri 1	5	6	30
Uji antimalarial seri 2	5	9	45
Jumlah mencit total (ekor)			75

3.6.5 Pemeliharaan Hewan

Hewan percobaan ditempatkan pada kandang ukuran 425 x 260 x 185 mm, yang terbuat dari polikarbonat. Hewan ditempatkan pada rak kandang dalam ruangan dengan pencahayaan dan sirkulasi udara yang baik. Suhu ruangan sesuai dengan suhu kamar, dengan kelembaban udara sekitar 26 – 27 %.

3.6.6 Makanan hewan percobaan

Makanan dalam bentuk pelet dengan komposisi makanan standar untuk mencit: Selulosa 4%; Protein 25%; Lemak 3,5% dan mineral-mineral 7%. Untuk satu hari mencit diberi makanan 10g/hari/ekor. Makanan berasal dari Lab. Hewan, Balitbangkes. Air minum menggunakan air kran (PAM) dan minum yang diperlukan untuk setiap hewan 1-2 mL/g makanan, diberikan tanpa batasan.

3.6.7 Estimasi besar sampel.

Besar sampel ditentukan berdasar rumus Frederrer sebagai berikut :

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

dimana t = Jumlah kelompok dan n = jumlah ulangan (mencit).

Jadi bila dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok maka jumlah minimum mencit dalam tiap kelompok adalah 4 ekor.

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1 Pembuatan ekstrak etanol 70% *Andrographis paniculata* L.

Pembuatan ekstrak yang digunakan dalam percobaan ini dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Simplisia dikeringkan, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh. Serbuk ditimbang sejumlah 250 g dibasahi dengan pelarut etanol 70% didiamkan selama 18 jam dalam wadah tertutup dari gelas. Maserat kemudian disaring dan residu dimasrasi lagi dengan etanol 70%. Maserasi dilakukan hingga 3 tahap. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dikentalkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak kental diuapkan dalam cawan porselen yang telah ditara kemudian diuapkan di atas tangas air dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ hingga etanol menguap dan diperoleh ekstrak kering. Rendemen ekstrak dihitung. (Depkes RI,2000)

3.7.2 Pembuatan ekstrak etanol 80% *Arthrospira platensis*

Serbuk spirulina sebanyak 100 g dimaserasi dengan ethanol 80% sebanyak 500 ml, disertai pengadukan selama 20 menit, pada suhu 60° C. Filtrat kemudian disaring dan terhadap residu dilakukan remaserasi kembali sebanyak 2 kali. Cara ekstraksi ini akan menghasilkan *Total fatty acid (TFA)* terbanyak. (Chaiklahan, R., et al., 2008) Ekstraksi spirulina dengan ethanol akan menghasilkan komponen yang mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi, diantaranya yaitu flavonoid dan fenolik. (Salamatullah, A., 2014)

3.7.3. Karakterisasi ekstrak

3.7.3.1 Penapisan fitokimia

a. Tanin

Sebanyak 20 mg sampel tumbuhan yang telah dihaluskan ditambah etanol sampai sampel terendam. Kemudian sebanyak 1 ml larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau.

a. Saponin

Sebanyak 2 g sampel tumbuhan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah air suling sehingga seluruhnya terendam, dididihkan selama 2-3 menit dan selanjutnya didinginkan, kocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

b. Steroid dan triterpenoid

Sebanyak 50-100 mg sampel tumbuhan yang telah dihaluskan, ditempatkan pada plat tetes dan ditambahkan asam asetat anhidrat sampai terendam seluruhnya, dibiarkan selama kira-kira 15 menit, enam tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah jingga atau ungu, sedangkan adanya steroid ditunjukkan dengan warna biru.

c. Flavonoid

Sebanyak 200 mg sampel tumbuhan yang telah diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g serbuk Mg. Hasil

positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit.

d. Alkaloid

Sebanyak 4 g sampel tumbuhan yang telah dihaluskan ditambahkan kloroform secukupnya lalu dihaluskan lagi. Kemudian ditambah 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Larutan disaring ke dalam tabung reaksi, dan filtrat ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes. Filtrat dikocok dengan teratur kemudian dibiarkan beberapa lama sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 2,5 ml untuk dianalisis dengan pereaksi Mayer, Dragendorf dan Wagner. Terbentuk endapan putih bila direaksikan dengan Mayer, dengan pereaksi Dragendorf terbentuk endapan merah jingga dan pereaksi Wagner terbentuk endapan coklat. (Dekes RI, 2000)

3.7.3.2 Penetapan kadar andrografolid dalam ekstrak sambiloto dengan metode HPLC.

Penetapan kadar andrografolid menggunakan HPLC Shimadzu model-LC2010 CHT, menggunakan kolom C 18 (250 nm x 4,6 nm). Pembawa elusi yaitu methanol dengan *flow rate* 1,5 ml/menit. Deteksi menggunakan Lampu D2 pada panjang gelombang 223 nm. Kalibrasi dilakukan dengan menggunakan *LC Solution Software*. Fase gerak yaitu metanol : air (65:35).

Ekstrak sambiloto ditimbang sebanyak 0,1g, ditambahkan 10 ml metanol dan dilarutkan dengan sonikator selama 3x30 menit. Kemudian sampel disaring. Semua ekstrak metanol dikumpulkan, volume disesuaikan sampai 50 ml, dan difilter dengan filter membran 0,45 μ m. Sebagai larutan standar yaitu andrografolid (99,8%) sebanyak 10 μ g yang dilarutkan dalam 100 ml metanol sehingga konsentrasi larutan menjadi 100 μ g/ml. Kemudian larutan standar ini diencerkan menjadi 35 ppm.

Sebanyak 20 μ l aliquot sampel/standar diinjeksikan pada HPLC. Analisa HPLC dilakukan selama 15 menit. Waktu retensi andrografolid yaitu $2,871 \pm 0,004$ menit. Kemudian ditetapkan kadar andrografolid (Sharma, 2012)

3.7.3.3 Penetapan Total Flavonoid dalam Ekstrak dan powder Spirulina dengan Spektrofotometer UV-VIS

Prosedur penentuan kandungan total flavonoid menggunakan metode Depkes RI, 2000). Flavonoid ditetapkan kadarnya sebagai aglikon dengan terlebih dahulu dilakukan hidrolisis dan selanjutnya dilakukan pengukuran spektrofotometri dengan mereaksikan AlCl_3 yang selektif dengan penambahan Heksametilentetramina pada panjang gelombang maksimum.

a. Cara kerja hidrolisis:

Timbang tepat ekstrak yang setara 200 mg simplisia dan masukkan ke dalam 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 (gunakan pendingin air/refluk) selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas ke dalam labu ukur 100 ml. Residu hidrolisis ditambah 20 ml aseton untuk dididihkan lagi sebentar, lakukan dua kali dan filtrat dikumpulkan semua ke dalam labu ukur. Setelah labu ukur dingin, volume ditepatkan menjadi 100 ml dan kocok rata. Dua puluh milliliter filtrate hidrolisa dimasukkan ke corong pisah dan ditambahkan 20 ml H_2O selanjutnya lakukan ekstraksi kocok, pertama dengan 15 ml etilasetat. Kemudian 2x dengan 15 ml etil asetat ke dalam labu ukur 50 ml. Untuk replikasi spektrofotometri, lakukan prosedur ini sebanyak 3-4 kali.

b. Cara kerja spektrofotometri:

Masukkan larutan 10 ml larutan fraksi etilasetat (hidrolisa) ke dalam labu ukur 25 ml, tambahkan 1 ml larutan 2 g AlCl_3 dalam 100 ml larutan asam asetat glasial 5%v/v dalam methanol secukupnya. Hasil reaksi siap diukur pada spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm setelah 30 menit berikutnya pada panjang gelombang maksimum. Perhitungan kadar menggunakan bahan standar quercetin dengan menggunakan kurva baku dan nilai kadar terhitung sebagai bahan standar tersebut.

3.7.4 Uji Antimalaria

3.7.4.1 Pelaksanaan percobaan

Percobaan ini menggunakan 2 seri kelompok perlakuan. Seri pertama, mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yang terdiri dari 6 ekor mencit pada setiap kelompok, untuk mendapatkan data persen parasitemia dan persen ketahanan hidup (*survival*). Seri kedua mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yang terdiri dari 3 ekor mencit pada setiap kelompok, untuk mendapatkan data jumlah eritrosit dan kadar Hb serta persentase apoptosis sel limpa pada 3 titik waktu (hari ke-3, 10, 21). Kelompok tersebut terdiri dari kelompok AP (mencit diinfeksi *P. berghei* yang diterapi ekstrak sambiloto), kelompok AP+ES (mencit diinfeksi *P. berghei* yang diterapi kombinasi sambiloto dan ekstrak spirulina), kelompok AP+PS (mencit diinfeksi *P. berghei* yang diterapi kombinasi sambiloto dan powder spirulina), kelompok kontrol (mencit diinfeksi *P. berghei* dan diberi CMC), kelompok DHP (mencit diinfeksi *P. berghei* yang diterapi DHP).

Tablet DHP diberikan dengan dosis 195 mg/kg BB (mengandung 15,5 mg dehidroartemisinin dan 124 mg piperakuin) dengan cara meminumkannya dengan menggunakan sonde berturut-turut setiap hari selama 4 hari. Ekstrak kombinasi diberikan peroral melalui sonde 3 hari sebelum mencit diinfeksi (H-3), kemudian hewan diinfeksi *P. berghei* (H0), selanjutnya diberi ekstrak bahan uji lagi selama penelitian hingga hari terakhir percobaan.

Pada seri pertama, bahan uji diberikan 3 hari sebelum induksi (H-3 s.d H0). Mencit diinfeksi *P. berghei* pada H0. Kemudian dilakukan pembuatan preparat ulas untuk menentukan angka parasitemia pada hari ke 3, 10, 15, 21 dan 28. Setelah itu dilakukan analisa persen parasitemia dan *survival* selama infeksi.

Pada seri kedua, bahan uji diberikan sejak 3 hari sebelum induksi H-3. Mencit diinfeksi *P. berghei* pada H0. Pemberian bahan uji diteruskan hingga H21. Pengambilan darah untuk pemeriksaan parameter hematologi dan pengambilan organ limpa dilakukan dengan cara mengorbankan 3 ekor mencit pada tiap kelompok pada hari ke 3, 10 dan 21. Mencit dianestesi dengan 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 m, kemudian dilakukan pengambilan darah dari *vena*

orbitalis sebanyak 1,5 ml dengan antikoagulan EDTA, untuk analisa hematologi. Setelah mencit mati mencit dibedah dan dilakukan pengambilan organ limpa untuk pemeriksaan apoptosis sel limpa. (Tripathy, S., 2012)

3.7.4.2 Induksi *Plasmodium berghei*

Proses inokulasi *Plasmodium berghei* diinfeksi secara intraperitoneal (i.p) suspensi parasit stok sebanyak 0,1 ml per ekor mencit secara i.p pada 5 ekor mencit donor. Setelah 4-5 hari, mencit yang diinfeksi dimonitor parasitemianya dengan cara mengambil darah dari perifer setiap hari dari ujung ekor, kemudian kepadatan parasit dalam darah (parasitemia) diperiksa melalui pengamatan dengan mikroskop.

Bila tingkat parasitemia mencit donor telah mencapai lebih dari 30% maka dilakukan pengambilan darah dari jantung menggunakan *syringe* setelah terlebih dahulu mencit dibius dengan ketamin dan silazine. Darah yang diperoleh dari jantung ditampung dalam tabung yang mengandung antikoagulan heparin, kemudian semua darah yang diperoleh dicampur.

Untuk menghitung jumlah eritrosit per mikroliter, dilakukan dengan menghitung jumlah eritrosit dengan alat *hematologi analyzer*. Setelah itu, terhadap darah EDTA yang telah dicampur, dilakukan pengenceran dengan PBS hingga $1,3 \times 10^6$ eritrosit terinfeksi parasit per milliliter, lalu diinfeksi ke hewan coba dengan volume 0,1 ml secara intraperitoneal sehingga setiap mencit diinfeksi $1,3 \times 10^5$ eritrosit terinfeksi parasit per milliliter. (Moll, K., et al., 2008)

3.7.4.3 Penetapan dosis

Dosis dehidroartemisinin piperakuin (DHP) yang dipakai sebagai kontrol positif adalah 195 mg/kg BB (mengandung 15,5 mg dehidroartemisinin dan 124 mg piperakuin) tablet DHP yang telah ditimbang, digerus dengan mortar, kemudian diencerkan dengan menggunakan campuran akuades dan Na CMC 0,5% dan diaduk menggunakan vortex.

Dosis ekstrak sambiloto yang dipakai adalah 200 mg/kg BB mencit, sesuai dosis yang telah memberikan aktivitas penghambatan terhadap *P. berghei* pada mencit dan merupakan dosis yang aman secara subkronik (Kusumawardhani, D, 2005; Gaur P, 2014) Sedangkan dosis spirulina powder yang digunakan adalah dosis 130 mg/Kg BB. Hal ini didasarkan pada uji toksisitas sub kronik pada mencit, dosis 130 mg/kg BB selama 28 hari, merupakan dosis yang aman. (Murtini J.T., 2010) Dosis ekstrak spirulina yang digunakan mengacu pada dosis powder spirulina yang dikalikan dengan persen rendemen ekstrak etanol yang diperoleh.

Ekstrak sambiloto dicampur dengan spirulina powder dan dilarutkan dengan Na CMC 0,5% dengan dosis seperti yang telah diuraikan di atas, serta volum pemberian maksimal 1 ml/30 g BB. Pemberian formula bahan uji pada mencit dilakukan 3 hari sebelum induksi (H-3), kemudian seluruh mencit diinduksi *P. berghei* (H0), dan dilanjutkan kembali pemberian formula bahan uji hingga akhir percobaan H28 untuk seri pertama dan H21 untuk seri ke dua.

3.7.4.4 Perhitungan parasitemia

Pemeriksaan parasitemia dilakukan dengan mengambil darah dari ekor mencit dengan melakukan pengurutan dari pangkal hingga ujung ekor untuk mengeluarkan darah kemudian diletakkan pada ujung gelas preparat dan dibuat apusan tebal dan tipis. Setelah apusan kering kemudian difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% didiamkan selama 30 menit setelah itu dicuci dengan air mengalir. Sediaan apus darah disiapkan untuk hitung parasitemia. Pemeriksaan dengan mikroskop pembesaran 100X dengan penambahan minyak imersi.

Parasitemia menunjukkan kepadatan sel darah terinfeksi parasit dalam 1000 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 :

$$\text{Parasitemia} = \left(\frac{\text{eritrosit yang terinfeksi parasit}}{\text{total eritrosit}} \right) \times 100\%$$

3.7.4.5 Analisa Hematologi

Sejumlah 1,0 ml darah ditambah antikoagulan 45µl EDTA 10% kemudian dilakukan analisa hematologi dengan alat *hematologi analyzer*, dengan parameter utama jumlah eritrosit dan kadar Hb.

3.7.4.6 Pemeriksaan Apoptosis Sel limpa (ekspresi caspase-3)

Pemeriksaan *Cytosolic aspartate-specific cysteine protease-3* (caspase-3), menggunakan prosedur standar pewarnaan imunohistokimia. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi poliklonal caspase-3 (*rabbit polyclonal anti-mouse caspase-3*, (Abcam), polymer HRP yang dikonjugasikan dengan antibodi sekunder (*The Envision+Dual Link System-HRP* (Dako). Ekspresi caspase-3 dilihat secara mikroskopis yaitu dengan mengamati pewarnaan kecoklatan karena dari reaksi antibodi anti caspase-3 yang divisualisasi dengan oleh kromogen DAB (Dako). Dilakukan tiga pengulangan untuk tiap perlakuan pada percobaan ini. Penghitungan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Nikkon) pada 10 lapangan pandang dengan perbesaran 1000 kali. Jumlah ekspresi caspase-3 dihitung dengan cara menghitung jumlah sel limpa yang menunjukkan pewarnaan kecoklatan pada 10 lapang pandang. (Maritha, I.D, dkk.,2006).

Ada pun proses imunohistokimia dilakukan dengan cara:

(petunjuk *Dako Envision Dual link system HRP*):

- a. Preparat sudah mengalami proses deparafin, area dibersihkan dengan *lint-free tissue*. Kemudian dicover dengan *dual endogenous enzyme block* secukupnya. Setelah itu diinkubasi 5-10 menit, kemudian dibilas dengan akuades atau larutan buffer, hindari langsung ke jaringan, tempatkan di *buffer bath*.
- b. Slide dibersihkan terlebih dahulu, kemudian ditetesi dengan antibodi caspase 3 yang telah diencerkan secukupnya (sesuai optimasi) hingga menutupi specimen. Inkubasi selama 30 menit. Bilas dengan air mengalir dengan botol semprot, hindari mengalirkan air ke jaringan.
- c. Sisa buffer pada slide dibersihkan kemudian ditetesi dengan Polymer-HRP sampai menutupi specimen, inkubasi 30 menit. Bilas seperti di atas, dan tempatkan pada *buffer bath*.

- d. Sisa buffer pada slide dibersihkan kemudian ditetaskan larutan substrat-kromogen hingga menutupi specimen. Inkubasi selama 5-10 menit. Bilas dengan air mengalir dengan botol semprot, hindari mengalirkan air ke jaringan.
- e. Preparat di *counterstain* dengan hematoksin, slide dibilas selama 2-5 menit
- f. Spesimen di *mounting* dan di *cover slip*

3.8 Analisis data

Analisa data terhadap persen parasitemia, persen *survival*, jumlah eritrosit dan kadar Hb, serta persen apoptosis sel limpa dilakukan dengan dengan uji Anova satu arah yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil.

3.9 Pertimbangan etik penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai subyek penelitian, maka perlu dimintakan persetujuan etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Beberapa tanaman obat yang telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antiplasmodium, di antaranya yaitu sambiloto (*Andrographis paniculata* L.) Ekstrak sambiloto memiliki efek antimalaria falciparum *in-vitro* dan efek maksimum pada dosis 200 µg/ml. Pengaruh ekstrak sambiloto sebagai antimalaria terdapat dalam monoterapi dan dalam kombinasi dengan klorokuin dan artemisinin. (Zein, 2013) Hasil penelitian klinis menunjukkan bahwa efikasi antimalaria sambiloto tunggal 250, 500 mg, kombinasi sambiloto 250 mg masing-masing dengan klorokuin dan artesunat adalah 90,9; 90,5; 90,2 dan 95,2% ($p>0,3$). (Zein, 2009) Pemberian ekstrak herbal sambiloto berpengaruh meningkatkan *survival* dan keadaan umum mencit selama infeksi, namun tidak berpengaruh pada peningkatan eritrosit mencit Balb C selama perjalanan infeksi *P. berghei* Anka. (Kisdjamiatun, 2004)

Penggunaan mikronutrien yang bersifat antioksidan pada terapi obat pada mencit antimalaria memberikan hasil yang lebih baik. (Iribhogbe, et al., 2013) Antioksidan bekerja dengan menetralkan radikal bebas yang dihasilkan parasit dan sistem imun, menghambat peroksidasi membran lipid, sehingga membantu mempertahankan eritrosit yang terinfeksi (iRBC) agar tidak lisis. Dengan demikian dapat mengurangi resiko anemia pada malaria (Tjahyani, 2010).

C-fikosianin dari *Spirulina platensis* memberikan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif pada protein plasmid DNA dan membran eritrosit. Pemberian bubuk spirulina dosis 250 dan 500 mg/kg BB selama 14 hari pada tikus putih, dapat mencegah penurunan Hb, eritrosit dan leukosit tikus yang diinduksi siklofosamid. (Dewi R.S, 2014)

Kelompok uji yaitu terdiri dari kelompok AP (ekstrak sambiloto), kelompok AP+ES (kombinasi sambiloto dan ekstrak spirulina), kelompok AP+PS (kombinasi sambiloto dan powder spirulina), kelompok kontrol (CMC), kelompok DHP. Seluruh mencit diinfeksi *P. berghei* pada hari ke 0. Ekstrak bahan uji diberikan 3 hari sebelum infeksi (H-3) dan setiap hari, dengan interval 24 jam,

selama 28 hari setelah infeksi. Data persen parasitemia, jumlah eritrosit dan kadar Hb serta persen apoptosis sel limpa diambil pada H3, H10 dan H21. Pengolahan data dilakukan dengan uji Anova satu arah yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil.

Perhitungan dosis didasarkan pada dosis yang sub kronik yang aman untuk digunakan pada mencit serta berkhasiat antimalaria. Pemberian ekstrak sambiloto pada penelitian ini dilakukan selama 28 hari, karena bila hanya diberikan 4 hari (D0-D3) seperti pada pemberian antimalaria konvensional, maka pertumbuhan parasit mengalami peningkatan setelah penghentian pemberian ekstrak sambiloto. Hal ini disebabkan karena dalam tubuh mencit masih tersisa parasit yang masih hidup, yang dapat mengalami pembelahan kembali. Sementara itu bahan obat sudah diekskresikan keluar tubuh. Dosis ekstrak sambiloto 231,48 mg/Kg BB memberikan penghambatan 70% terhadap pertumbuhan *P. berghei* pada *The 4 day suppressive test of blood schizontocidal action*. (Kusumawardhani, D., 2005). Penggunaan ekstrak sambiloto sampai dengan dosis 300 mg/KgBB merupakan dosis yang aman pada pemberian selama 28 hari. (Gaur P., 2014)

Dalam penelitian ini digunakan dosis ekstrak sambiloto 200 mg/Kg BB atau 5 mg/25 g BB. Adapun dosis powder spirulina yang digunakan, ditetapkan berdasarkan penelitian Murtini, J.T dkk. (2010) yang menyatakan bahwa konsumsi powder spirulina sebanyak 1 g/70 kg BB manusia atau 130 mg/kg BB mencit selama 28 hari tidak menimbulkan kelainan organ mencit secara mikroskopis. Sedangkan dosis ekstrak spirulina ditetapkan berdasarkan rendemen ekstrak etanol spirulina yaitu 20% dari berat powder spirulina yang diekstrak.

Pemilihan dosis yang digunakan dalam penelitian ditetapkan setelah sebelumnya dilakukan optimasi dosis. Penggunaan dosis sambiloto sebesar 400 dan 900 mg/Kg BB sampai hari ke-4 dapat memberikan persen penghambatan parasit sebesar 89,84 dan 72,75%. (Kusumawardhani, D., 2005). Namun demikian, dosis tersebut tidak dapat diteruskan untuk pemberian dalam jangka waktu lama, karena beberapa hewan dalam tiap kelompok tidak bertahan hidup hingga akhir penelitian. Hal ini dimungkinkan karena ekstrak sambiloto mengandung saponin, besarnya konsentrasi saponin seiring dengan peningkatan dosis ekstrak sambiloto dapat menyebabkan hemolisis. Saponin menginduksi hemolisis dengan cara meningkatkan transport air pada kanal aquaporin. (Edagha,

Universitas Indonesia

I.A, et al., 2014) Eritrosit terinfeksi yang pecah dapat meningkatkan penyebaran parasit sehingga meningkatkan derajat parasitemia. (Tjahjani, S., 2010) Penelitian Bukoye, O., 2011, juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak sambiloto dosis 1000 mg/Kg BB setiap hari menyebabkan kematian pada mencit normal pada hari ke-32. Analisa hematologi menunjukkan peningkatan eritrosit, penurunan Hb serta peningkatan laju endap darah. (Bukoye, O., 2013)

Penetapan kadar flavonoid dalam powder dan ekstrak spirulina secara spektrofotometri menghasilkan kadar flavonoid dalam ekstrak lebih besar daripada yang terkandung dalam powder spirulina. Namun demikian, dosis powder spirulina yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5x bobot ekstrak. Dengan demikian setiap hewan coba diberikan ekstrak atau powder spirulina yang memiliki kandungan flavonoid yang kurang lebih sama banyak.

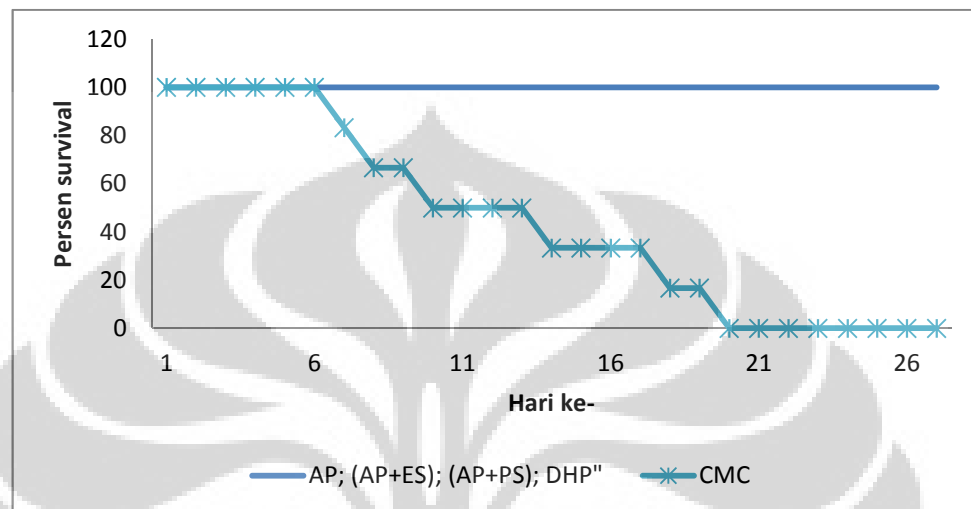
Tabel 4.1 Kadar zat aktif ekstrak dan powder spirulina serta ekstrak sambiloto

Sampel uji	Zat aktif	Kadar	Metode uji
Ekstrak spirulina	Flavonoid	0,64 % b/b	Spektrofotometri
Powder spirulina	Flavonoid	0,10% b/b	Spektrofotometri
Ekstrak sambiloto	Andrografolid	8,30 % b/b	HPLC

Tabel 4.2 Uji fitokimia ekstrak dan powder spirulina serta ekstrak sambiloto

	Ekstrak spirulina	Powder spirulina	Ekstrak sambiloto
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Tanin	-	-	-
Steroid	-	+	+
Saponin	+	+	+
Hidrokuinon	-	-	-
Triterpenoid	+	-	-

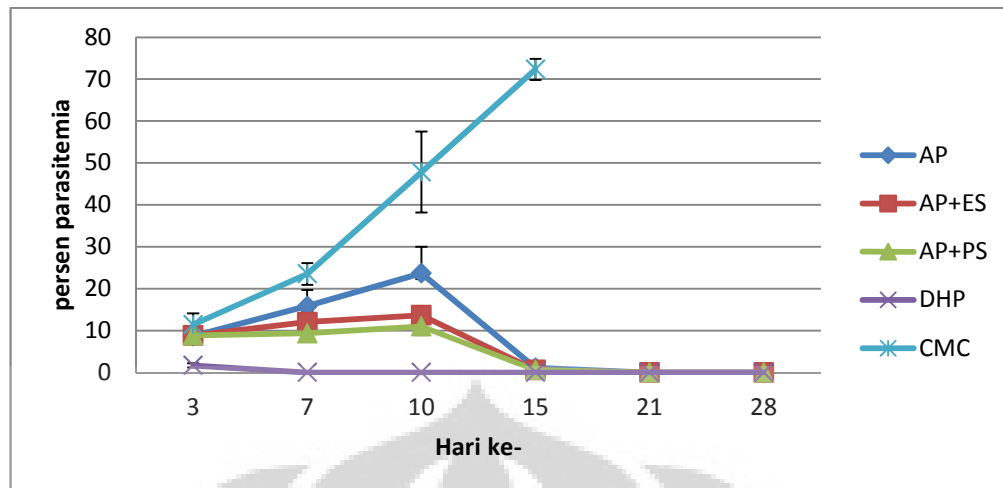
Analisa fitokimia ekstrak dan powder spirulina serta ekstrak sambiloto dilakukan dengan metode visualisasi warna. Ekstrak dan powder spirulina masing-masing mengandung flavonoid, demikian juga ekstrak sambiloto.



Keterangan: Kelompok: AP= sambiloto 200 mg/kg BB; AP+ES= sambiloto 200 mg/kg BB + ekstrak spirulina 26 mg/kgBB; AP+PS= sambiloto 200 mg/kg BB +powder spirulina 130 mg/kgBB; DHP= dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6 mg; piperakuin 124,5 mg/kgBB); CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%

Gambar 4.1 Grafik *survival* hewan coba selama penelitian

Kelompok AP, AP+ES, AP+PS dan DHP menunjukkan *survival* 100%, berarti bahwa semua hewan coba pada ketiga kelompok hidup seluruhnya hingga akhir penelitian. Mekanisme kerja obat herbal sebagai antimalaria yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan parasit atau membunuh parasit secara tidak langsung. (Percario, S., et al., 2012). Pada kelompok CMC terjadi kematian secara bertahap mulai dari hari ke 7 hingga hari ke 20 setelah infeksi. Pada hari ke-21, hewan coba pada kelompok CMC telah mati seluruhnya.



Keterangan: Kelompok: AP= sambiloto 200 mg/kg BB; AP+ES= sambiloto 200 mg/kg BB + ekstrak spirulina 26 mg/kgBB; AP+PS= sambiloto 200 mg/kg BB +powder spirulina 130 mg/kgBB; DHP= dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6 mg; piperakuin 124,5 mg/kgBB); CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%

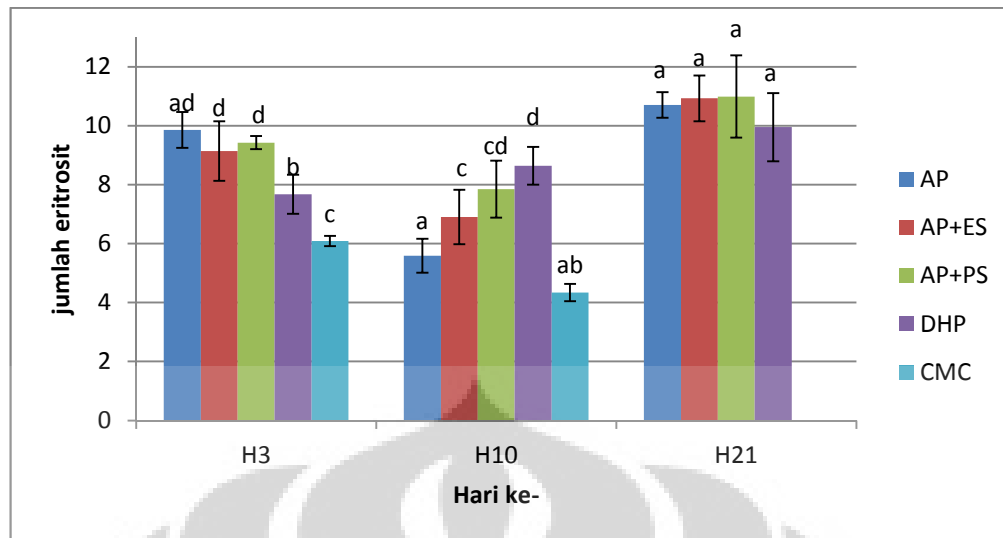
Gambar 4.2 Grafik persen parasitemia

Pada hari ke-3, terdapat perbedaan yang signifikan ($p= 0,02$) pada persen parasitemia antara semua kelompok perlakuan dengan kelompok DHP. Hal ini menunjukkan bahwa obat DHP telah memperlihatkan efek schizontosida. Data parasitemia pada hari ke-10 di analisa dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan signifikansi ($p=0,00$), berarti ada perbedaan parasitemia yang signifikan antar kelompok. Perbedaan persentase parasitemia yang signifikan terjadi antara semua kelompok perlakuan dan kelompok DHP dengan kelompok CMC. Signifikansi ($p=0,032$) juga terjadi pada kelompok AP (sambiloto) dan kelompok AP+PS (kombinasi powder spirulina+sambiloto). Data ini menunjukkan bahwa kombinasi spirulina dan sambiloto dapat mempercepat eliminasi parasit dibanding kelompok perlakuan sambiloto saja. Sementara itu kelompok kombinasi sambiloto dan ekstrak spirulina (AP+ES) tidak menunjukkan signifikansi ($p=0,06$) terhadap kelompok sambiloto (AP). Perbedaan hasil yang dipresentasikan antara ekstrak spirulina dan powder spirulina kemungkinan terkait dengan adanya senyawa larut air yang bersifat antiparasit, yang terdapat dalam powder spirulina namun tidak terdapat pada ekstrak.

C -fikosianin dalam *Arthrospira platensis* adalah antioksidan alami atau primer kelompok fitokimia golongan flavonoid dan larut dalam air. Struktur kimia pada c-fikosianin, dapat menghilangkan radikal peroksida dengan menambahkan satu atom hidrogen. Kemampuan menghambat radikal hidroksil tergantung dari kadar phycocyanin. (Dewi R.S, 2014)

Persentase parasitemia kelompok CMC terus naik hingga > 80% sehingga menyebabkan kematian pada seluruh hewan kelompok ini pada hari ke 20. 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 ekstraselular menghasilkan O_2^- (superoksida). NO bereaksi dengan O_2^- menghasilkan peroksinitril yang dapat berinteraksi dengan berbagai molekul biologi dan bersifat merusak. (Tripathy, S., et al., 2012)

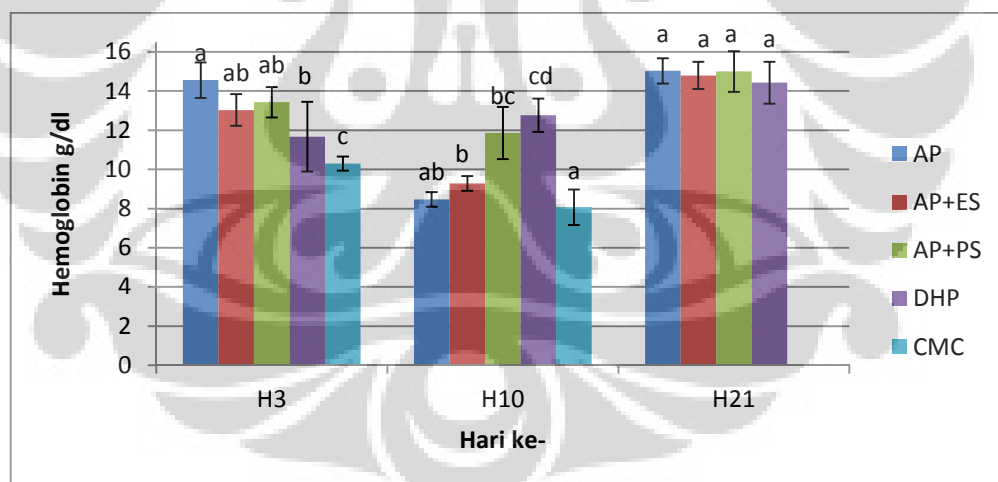
Pada hari ke 15 setelah infeksi terjadi penurunan tingkat parasitemia yang cukup tajam (Gambar 4.2). Seluruh kelompok perlakuan herbal menunjukkan parasitemia yang hampir mendekati 0%. Pada hari ke-21 setelah infeksi, seluruh kelompok perlakuan kecuali kelompok CMC telah dapat mengeliminasi parasite (parasitemia 0%). Data ini menunjukkan bahwa seluruh kelompok perlakuan herbal sudah menunjukkan tanda kesembuhan dari infeksi. Terjadinya eliminasi parasite pada hari ke 15 dikarenakan peran andrografolid dalam menghambat penyebaran parasit pada fase *ring* kemungkinan berhubungan dengan fungsinya sebagai “*transcription blockers*” yaitu menghambat sintesis protein dan asam nukleat. (Mishra, K., 2011) Secara umum, mekanisme kerja obat herbal sebagai antimalaria yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan parasit atau membunuh parasit secara tidak langsung. Seperti yang dikutip dari Percario, S., et al. 2012, ”Tidak seperti pada umumnya mekanisme obat antimalaria yaitu menginduksi stress oksidatif, antimalaria yang berasal dari bahan alam bekerja dengan memodulasi sistem imun, dengan tidak secara langsung membunuh parasit.” Dengan demikian dihasilkan mekanisme antiparasit dengan meminimalkan perubahan pada kesetimbangan redoks host.



Keterangan: Kelompok: AP= sambiloto 200 mg/kg BB; AP+ES= sambiloto 200 mg/kg BB + ekstrak spirulina 26 mg/kgBB; AP+PS= sambiloto 200 mg/kg BB +powder spirulina 130 mg/kgBB; DHP= dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6 mg; piperakuin 124,5 mg/kgBB); CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%

Huruf yang berbeda pada hari yang sama menyatakan perbedaan yang signifikan

Gambar 4.3 Grafik jumlah eritrosit (x10⁶/ml)



Keterangan: Kelompok: AP= sambiloto 200 mg/kg BB; AP+ES= sambiloto 200 mg/kg BB + ekstrak spirulina 26 mg/kgBB; AP+PS= sambiloto 200 mg/kg BB +powder spirulina 130 mg/kgBB; DHP= dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6 mg; piperakuin 124,5 mg/kgBB); CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%

Huruf yang berbeda pada hari yang sama menyatakan perbedaan yang signifikan

Gambar 4.4 Grafik kadar hemoglobin (g/dl)

Pada kelompok DHP hari ke-3, jumlah eritrosit mengalami penurunan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok AP ($p=0,01$) dan dibandingkan dengan kelompok AP+ES ($p=0,015$). Hal ini dikarenakan DHP mengandung piperakuin yang merupakan turunan klorokuin. Klorokuin mempunyai mekanisme mencegah terjadinya hemozoin dan menyebabkan akumulasi free heme. Free heme adalah pembangkit radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan serius pada host dan parasite. Kelompok heme ini mengandung atom Fe^{2+} yang mengkatalisasi reaksi Fenton dan Haber-Weiss yang menghasilkan radikal bebas. (Percario, S., et al 2012) Radikal bebas menyebabkan peroksidasi lipid di membrane sel darah merah dan mempersingkat umur eritrosit dengan menyebabkan kerusakan oksidatif di membran sel sehingga terjadi hemolysis. (Murray.R, 2009)

Pada hari ke-10 terjadi penurunan jumlah eritrosit dan hemoglobin terutama pada kelompok CMC dan kelompok AP. Aktivitas hemoglobin proteolisis pada intra eritrosit dimana Fe^{2+} teroksidasi menjadi Fe^{3+} meningkat pada 10 hari pertama infeksi. Elektron yang dihasilkan bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan superoksida. (Tripathy, S., et al., 2012) Superoksida dan agen pengoksidasi lainnya yang membentuk methemoglobin yang tidak mampu mengangkut oksigen. (Murray,R., 2009) Hal ini menjelaskan mengapa pada kelompok yang dikombinasikan dengan powder spirulina (kelompok AP+PS) tidak terjadi penurunan eritrosit dan hemoglobin secara signifikan. C-fikosianin yang merupakan pigmen larut air dari *Spirulina platensis* memberikan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif pada protein plasmid DNA dan membran eritrosit. Pemberian bubuk spirulina dosis 250 dan 500 mg/kgBB selama 14 hari pada tikus putih, dapat mencegah penurunan Hb, eritrosit dan leukosit tikus yang diinduksi *cyclophosphamid*. (Dewi R.S, 2014) Pemberian ekstrak air spirulina dosis 100 mg/Kg BB, setiap hari selama 14 hari pada tikus normal dapat meningkatkan secara signifikan RBC, Hb, PCV dibanding dengan kontrol normal. (Davis, et al, 2003 dalam Elmalawany, 2014) Pengaruh spirulina pada gambaran hematologi disebabkan oleh adanya c-fikosianin yang dapat menstimulasi produksi eritropoietin (EPO) untuk menginduksi hematopoiesis. (Henrikson, 1994, dalam Elmalawany, 2014)

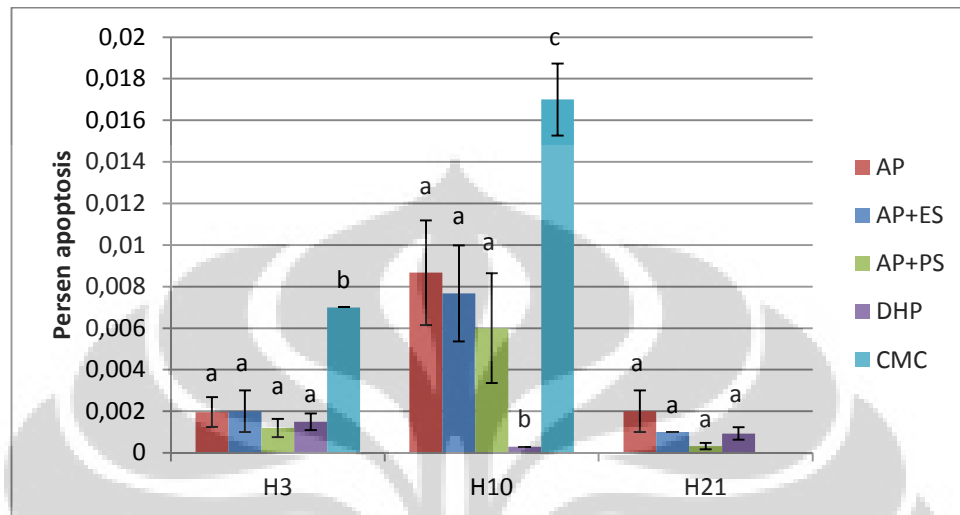
Infeksi *P. berghei* meningkatkan kadar lipid peroksidasi pada eritrosit pada 10 hari pertama infeksi. Hal ini menyebabkan eritrosit mudah rusak atau hemolisis. (Tripathy, S., et al., 2012) Hemolisis juga dapat terjadi karena penghancuran eritrosit terinfeksi maupun tidak terinfeksi oleh sistem retikuloendotelial limpa. Deformabilitas eritrosit yang menjadi kaku menyebabkan eritrosit tidak dapat melalui sinusoid limpa, eritrosit tidak dapat lolos dan akan difagositosis oleh makrofag. Berkurangnya deformabilitas eritrosit disebabkan oleh kegagalan pompa Na^+/K^+ , dengan akibat akumulasi ion Na^+ intraseluler. Kegagalan pompa Na^+/K^+ diduga disebabkan oleh peningkatan kadar NO yang dipicu oleh sitokin. Diseritropoiesis juga mungkin karena peranan TNF dan IFN γ dan IL yang dapat mengganggu produksi eritrosit. (Harijanto, PN., 2009)

Terdapat perbedaan kemaknaan hasil antara kelompok AP dan (AP+ES), dalam hal jumlah eritrosit dan kadar Hb pada hari ke-10. Jumlah eritrosit antara kelompok AP dan (AP+ES) berbeda bermakna ($p=0,041$), namun kadar Hb antara kelompok AP dan (AP+ES) tidak berbeda bermakna ($p=0,264$). Seharusnya ada keselarasan antara jumlah eritrosit dan kadar Hb pada setiap kelompok. Sebagai acuan, pada penelitian ini dilakukan pengukuran jumlah eritrosit pada mencit normal yaitu $8 \times 10^6/\text{ml}$, sedangkan kadar Hb mencit normal yaitu 12 g/dl. Kadar Hb yang rendah pada kelompok (AP+ES) dimungkinkan karena eritrosit pada kelompok (AP+ES) mengandung badan Heinz, sehingga jumlah eritrosit tidak selaras dengan kadar hemoglobin. Teroksidasinya hemoglobin ditandai dengan adanya methemoglobin dan atau badan Heinz. Beberapa gugus SH hemoglobin mengalami oksidasi sehingga terjadi pengendapan protein di bagian dalam sel darah merah membentuk Badan Heinz. Adanya badan Heinz menunjukkan bahwa sel darah merah telah mengalami stress oksidatif. (Murray, R., 2009)

Pada hari ke-21 setelah infeksi, seluruh kelompok perlakuan kecuali kelompok CMC telah dapat mengembalikan jumlah eritrosit ke level normal. Peningkatan jumlah eritrosit dan kadar glutathione terjadi pada pemberian ekstrak sambaloto secara subkronik. Hal ini dikarenakan glutathione dapat mencegah RBC dari radikal bebas, dengan demikian dapat menjaga integritas membran RBC. (Gaur P., 2014) Sedangkan pada kelompok CMC, hemolisis terjadi karena tidak adekuatnya persediaan antioksidan, dimana antioksidan endogen seperti SOD dan

Universitas Indonesia

GSH telah mengalami oksidasi. Peningkatan kadar MDA yang merupakan penanda stres oksidatif terkait dengan penurunan kadar SOD dan GSH. (Sharma, L., et al., 2012)



Keterangan: Kelompok: AP= sambilanoto 200 mg/kg BB; AP+ES= sambilanoto 200 mg/kg BB + ekstrak spirulina 26 mg/kgBB; AP+PS= sambilanoto 200 mg/kg BB + powder spirulina 130 mg/kgBB; DHP= dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6 mg; piperakuin 124,5 mg/kgBB); CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%
Huruf yang berbeda pada hari yang sama menyatakan perbedaan yang signifikan

Gambar 4.5 Grafik persen apoptosis sel limpa

Peningkatan dan penurunan persen apoptosis sel limpa pada grafik yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 berhubungan dengan persen parasitemia (gambar 4.2) Tingkat apoptosis sel host berkorelasi secara signifikan dengan tingkat infeksi *P. berghei*. (Kapoor, G. et al., 2011) Pada hari ke-3 (awal infeksi) tidak ditemukan perbedaan persentase apoptosis yang signifikan diantara semua kelompok. Pada kelompok DHP menunjukkan persentase apoptosis yang lebih tinggi daripada persentase apoptosis kelompok DHP pada hari ke-10 dan 21. Hal ini disebabkan karena obat DHP yang diberikan selama 3 hari pada mencit masih tinggi konsentrasinya dalam tubuh mencit dan mempengaruhi apoptosis. Obat-obat antimalarial merupakan pro-oksidan, karenanya obat-obat tersebut mempunyai efek farmakologi yang kuat. Mekanisme ini terdapat pada klorokuin, primakuin, artemisinin dan lain-lain. Mekanisme ini memberikan efek yang efektif pada destruksi parasit dengan efek samping yang minimal pada host.(Percario, 2012)

Pada hari ke-10 (puncak infeksi) terdapat perbedaan tingkat apoptosis kelompok AP, AP+ES dan AP+PS dengan kelompok DHP dan kelompok CMC. Dengan analisis Anova diikuti dengan uji LSD didapat signifikansi antara kelompok CMC, AP, AP+ES dan AP+PS dengan kelompok DHP (masing-masing 0,000; 0,000; 0,001 dan 0,005). Adanya perbedaan yang signifikan persen apoptosis pada semua kelompok perlakuan dengan kelompok CMC menandakan tingginya tingkat parasitemia kelompok CMC pada hari ke-10. Superoksida dan ROS yang dihasilkan pada infeksi parasit dapat berakibat pada kerusakan makromolekul seperti lipid, protein, DNA dan enzim antioksidan. (Tripathy, S., et al., 2012). Selain itu parasit dapat merangsang makrofag untuk mengeluarkan TNF- α yang memainkan peran penting dalam induksi apoptosis. (Keswani, 2013) Tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap persentase apoptosis diantara kelompok AP terhadap kelompok AP+ES dan AP+PS. Walaupun terlihat adanya persen apoptosis pada kelompok AP+PS yang lebih rendah dibanding dengan kelompok AP serta AP+ES, namun angka ini tidak berbeda secara statistik. Sehingga dapat dikatakan bahwa kombinasi spirulina dan sambiloto memberikan persentase apoptosis yang sama dengan kelompok yang diberi sambiloto saja.

Pada hari ke-21 semua kelompok perlakuan kecuali kelompok CMC dapat menurunkan persentase apoptosis, dengan angka yang tidak berbeda bermakna dengan kelompok DHP. Hal ini sejalan dengan persentase parasitemia yang hampir tereliminasi seluruhnya pada hari ke-21 pada semua kelompok kecuali kelompok CMC (Grafik 4.2) Aksi proteksi *A. paniculata* melindungi sel-sel hepar pada infeksi *P. berghei* yaitu melalui reaktifasi enzim antioksidan SOD. (Chander, R., et al 1995 dalam Jarukamjorn, K., 2008) Pemberian spirulina pada tikus 4 minggu sebelum diinduksi iskemia pada otak menunjukkan penurunan infark serebral dan penurunan aktivitas caspase-3 setelah infark dibanding tikus kontrol. Hal ini menunjukkan pemberian spirulina dapat memberikan proteksi melalui mekanisme antiapoptosis. (Wan, et al, 2010; Wang, Y., 2005) Dengan demikian penggunaan suplemen antioksidan mungkin efektif sebagai terapi adjuvan pada infeksi malaria untuk meminimalkan kerusakan pada host. (Percario, 2012)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

- a. Ekstrak sambiloto mengandung saponin, flavonoid dan terpenoid dengan kadar androgafolid 8,30% b/b. Sedangkan ekstrak dan powder spirulina mengandung saponin, steroid dan flavonoid, dengan kadar flavonoid masing-masing yaitu 0,64 dan 0,10% b/b yang dihitung sebagai kuersetin.
- b. Kombinasi ekstrak sambiloto dan powder spirulina (AP+PS) memberikan hasil yang bermakna dalam menekan angka parasitemia ($p=0,02$), meningkatkan eritrosit ($p=0,03$) dan hemoglobin ($p=0,01$) pada puncak infeksi, dibanding kelompok yang diberi sambiloto saja (AP).
- c. Seluruh kelompok uji kecuali kelompok CMC dapat *survive* atau bertahan hidup sampai akhir penelitian.
- d. Pemberian ekstrak sambiloto dan atau tanpa spirulina dapat menurunkan persen apoptosis sel limpa secara bermakna (AP $p= 0,001$; AP+ES $p= 0,000$; AP+PS $p=0,000$) dibanding dengan kelompok CMC pada puncak infeksi.

5.2 SARAN

- a. Dilakukan pengambilan data parasitemia di antara hari ke 10 dan hari ke 15, sehingga dapat diketahui secara tepat kapan parasit mulai tereliminasi.
- b. Dilakukan penelitian ke arah respon imun yang terlibat dalam eliminasi parasit terutama di antara hari ke 10 dan hari ke 15.

DAFTAR ACUAN

- Akowuah G.A, Zhari I, Mariam A, Yam MF. (2009) Absorption of *Andrographis paniculata* and its effect on CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology* 47(9), 2321-2325
- Agustin, Y. (2008) Pengaruh pemberian *Andrographis paniculata* pada produksi interferon gamma pada mencit yang diinduksi *Plasmodium berghei* Anka. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran. Universitas Diponegoro. Artikel ilmiah, tidak diterbitkan.
- Balitbangkes. (2013) Laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013.
- Bukoye, O. and Musbau, A. (2013) Immune modulation potentials of aqueous extract of *Andrographis paniculata* leaves in rat. *Researcher*, 3(1).
- Chaiklahan, R., et al. (2008). Lipid and fatty acid extraction from *Cyanobacterium spirulina*. *Science Asia*, 34, 299-305.
- Edagha, I.A, Atting, I.A, Bassey, R.B, Bassey, E.I, Ukpe, S.J. (2014) Erythropoietic and hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Nuclea latifolia* in mice infected with *Plasmodium berghei*. *American Journal of Medical Science*, 2(1), 7-12
- Wan, L.C, Yen, W.L, Radhakrisnan, A.K, Phaik E.L. (2010) Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(53).
- Depkes RI. (2000) *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan I, 1-38, Departemen Kesehatan RI, Direktorat Jendral Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Depkes RI. (2008) *Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia*. Cetakan I, 26-42. Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan . Departemen Kesehatan RI.
- Dewi, R.S. (2014) *Spirulina platensis* mencegah penurunan komponen darah perifer pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan cyclophosphamide. Tesis. Program Pasca Sarjana Biomedik, Universitas Udayana.
- Dkhil, M.E. (2009) Apoptotic change induced in mice splenic tissue due to malaria infection. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 42(13).
- Euoreopean Medicines Agency (EMA). (2012) Assessment report on *Andrographis paniculata* Nees, folium. www.ema.europa.eu
- Elmalawany, A.M, Salem, T.A, Mohamed, A.H dan Osman, G.Y. (2014) Effect of blue green algae on some biochemical and hematological markers in mice. *International Journal of Advanced Research*, 2(2), 568-574.
- Gaur, P. (2014) Evaluation of safety aspect of *Andrographis paniculata* in Swiss-Albino mice at sub acute level. *International Ayurvedic Medical Journal*, 2(5).

- Guha, M, Kumar, S, Choubay, V, Maity, P, Bandyopadhyay, U. (2006) Apoptosis in liver during malaria: Role of antioxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *The Faseb Journal*, 20 (8), 1224-1226.
- http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=184881. *Andrographis paniculata* Lamk diakses 3 Desember 2014, pk 17.40
- Harijanto, PN. (2009) *Malaria, dari molekular ke klinis*. Penerbit EGC, edisi 2, hal.58.
- Hubullah F, Marliah Santi. (2013) Gambaran penggunaan rapid diagnostic test parasite malaria di desa Pasir Mukti. *Aspirator*, 5, (2), 55-60
- Irawati, L., Acang, N., Irawati, N. (2008). Ekspresi tumor necrosis factor-alfa (TNFa) dan interleukin 10 (IL10) pada infeksi malaria falcifarum. *Majalah Kedokteran Andalas*, 1(32).
- Iribhogbe, et al. (2013) Antioxidant based combination therapy in malaria: In vivo study in *Plasmodium berghei* infected mice. *Biolife* (1)2, 70-77
- Jarukamjorn, K., and Nemoto, N. (2008) Pharmacological aspect of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide. *Journal of Health Science*, 54(4).
- Kapoor, G., Agbaje E.O, Oreagba I.A, Aina O.O, Ota A.D. (2011) *Plasmodium berghei* induce apoptotic changes in splenic and peripheral blood cells. *Tropical Biomedicine* 28(1), 119-124.
- Keswani, T, Bhattacharyya. (2013) Splenocyte apoptosis in *Plasmodium berghei* ANKA infection: possible role of TNF- α dan TGF- β . *Parasite Immunology*, 35, 73-90
- Kisdjamiatun, Sudaryanto, Kartikawati, H, Wibisono, A. (2004) Pengaruh ekstrak herbal *Andrographis paniculata* (sambiloto) terhadap anemia dan survival mencit Balb /c selama infeksi *Plasmodium berghei* Anka. *Jurnal Kedokteran Media Medika Indonesia FK UNDIP*, 39(3).
- Koka, Saisudha et al. (2009) Influence of Paclitaxel on Parasitemia and Survival of *Plasmodium berghei* Infected Mice. *Cell Physiol Biochem*, 23, 191-198.
- Kumar, V. and Bagai, U. (2014) Structural Changes in Spleen Architecture upon *Plasmodium berghei* (NK-65) Infection in BALB/c Mice. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* (IOSR-JPBS), 9(4). www.iosrjournals.org
- Kusumawardhani, D dan Widyawaruyanti, A. (2005) Efek antimalaria ekstrak sambiloto terstandar (parameter kadar andrografolida) pada mencit terinfeksi *P. berghei*. *Majalah Farmasi Airlangga*, 5,(1).
- Laminkara, A., et al. (2007) Malarial anemia: of mice and men. Review in translational hematology. *Blood Journal*. DOI 10.1182/blood-2006. www.bloodjournal.org. Diakses 26 Oktober 2014 pk 15.02.

- Maritha, I.D., Supranowo, Lyrawati, D. (2006) Ekspresi *cytosolic aspartate-specific cysteine protease* (caspase-3) pada jaringan hati *Rattus norvegicus* (Wistar) setelah pemberian subkronik aflatoksin B1 (AFB1). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 22(3).
- Mishra, K., Dash, A.P., Dey, N.(2011) Andrographolid: A novel diterpene lactone compound from *Andrographis paniculata* and its interaction with curcumin and artesunat. *Journal of Tropical Medicine*, vol 2011. Hindawi Publishing Corporation.
- Moll,K., Ljungström, I., Perlmann H., Acherf A., Wahlgren, M. (2008) Methods in malaria research. Fifth edition. American Type Culture Collection 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209
- Murray, R., Granner, D. (2009) *Biokimia Harper*. Edisi 27. Penerbit Buku Kedokteran EGC, 636-641.
- Murtini, J.T dkk. (2010) Uji toksisitas sub kronik *Spirulina platensis* secara in-vivo. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 5 (2).
- Nizar, Muhamad, dkk. (2013) Faktor yang mempengaruhi pembelian obat malaria di warung. *Aspirator*, 5(1), 9-15.
- Ozsoy, M.F., Oncul,O., Pekkafuli, Z., Pahsah, A., Yenen O.S. (2004) Splenic complications in malaria: report of two cases from Turkey. *Journal of Medical Microbiology* 53(12).
- Panosian, et al. (2000) Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolid from *Andrographis paniculata* fix combination Kan Jang in rats and human. *Phytomedicine*, 7(5), 357-364
- Percario, S., et al. (2012) Oxidative Stress in Malaria. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 16346-16347.
- Pleonsil, P and Suwanwong, Y. (2013) An in vitro study of c-phycoyanin activity on protection of DNA and human erythrocyte membrane from oxidative damage. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(5), 332-336
- Salamatullah, A. (2014) Characterization of extractio methds to recover phenolic-rich atioxidant from blue green alga (spirulina) using response surface approach. *Food Science and Technology Department, University of Nebraska Lincoln. Dissertation & Thesses in Food Science and Technology*. [http://digitalcommon. Unl.edu/foodscidiss/42](http://digitalcommon.Unl.edu/foodscidiss/42)
- Setyawati, I. (2009) Morfologi fetus mencit (*Mus musculus* L.) setelah pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). *Jurnal Biologi* 13(2).
- Sharma, M., Sharma, A., Tyagi, S. (2012) Quantitative HPLC analysis of andrographolide in *Andrographis paniculata* at two different stages of life cycle of plant. *Acta Chimica & Pharmaceutica Indica*, 2 (1), 1-7.
- Sharma, L., et al. (2012) Role of oxidative stress and apoptosis in the placental pathology of *Plasmodium berghei* infected mice. *Plos One*, 7 (3).

- Simamora D, Fitri, L. E. (2007) Resistensi obat malaria: Mekanisme dan peran obat kombinasi obat antimalarial untuk mencegah antimalarial drug resistance. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23 (2)
- Sitorus, H., dkk. (2011) Pola penggunaan tanaman obat tradisional di desa Segara Kembang dan desa Tungku Jaya di Kab Ogan Komering Ulu. *Jurnal Pembangunan Manusia*, 5 (1).
- Thawani, N. (2013) *Plasmodium* product contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induce proliferation of erythroid precursors. *Journal of Infectious Disease Advance Acces* , published September12. Major article.
- Tjahjani S, Khie Khiong. (2010) Potensi buah merah sebagai sntioksidan dalam mengatasi malaria berghei pada mencit strain Balb/C. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 60(12).
- Tripathy, S., Prasad S., Chakraborty, Roy S. (2012) Superoxide radical generation mediated *Plasmodium berghei* infection in Swiss mice. *Al Ameen Journal of Medical Science*, 5(1),69-81.
- U.S Departement of Health and Human Service. (2007) *Understanding malaria; Fighting an ancient scourge*. NIH Publication No.07-7139.
- Wang, Y. (2005). Dietary supplementation with blueberries, spinach or spirulina reduce ischemic brain damage. *Experimental Neurology*, 193, 75-84.
- Wulandari, A.F.S dan Irawanti,G. (2010) *Arthrospira platensis* sebagai terapi alternative pada anak HIV positif. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia*,1(1).
- Zein U. (2009) Perbandingan efikasi ekstrak herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) tunggal dan kombinasi masing-masing dengan artesunat dan klorokuin pada pasien malaria falsiparum tanpa komplikasi. Disertasi.Sekolah Pasca Sarjana. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Zein U, Fitri, L.E, Awaluddin S. (2013) Studi komparatif antimalaria pengaruh ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*), klorokuin dan artemisinin dan kombinasinya terhadap *Plasmodium falciparum* in-vitro. *Acta Medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine*, 45 (1).



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

Nomor : /UN2.F1/ETIK/2015

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Spirulina (*Arthrospira platensis*) pada Gambaran Hematologi dan Apoptosis Sel Limpa Mencit Terinfeksi *Plasmodium Berghei* Anka".

Peneliti Utama

: Tri Wahyuni Lestari, S.Farm

Principal Investigator

Nama Institusi

: Fakultas Farmasi UI

Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.



Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

* Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.

** Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini ethical approval harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Cibinong, Januari 2015

Nomor : /IPH.1.01/If.8/I/2015
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). **Tri Wahyuni Lestari**
 NPM : 1306433771
 Mhs. Univ. Indonesia
 Fak. Farmasi
 Gedung Pascasarjana Fakultas Farmasi UI
 Kampus UI, Depok
 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke “Herbarium Bogoriense”, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	Nama	Jenis	Suku
1	Sambiloto	Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees	Acanthaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setijo Rahajoe

NIP. 196706241993032004

Lampiran 3. Determinasi spirulina

	LABORATORIUM PENGUJIAN PUSAT PENELITIAN LIMNOLOGI LIPI Jl. Raya Jakarta – Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911 Telp. 021 8757976
---	--

FR.07/PR.5.8/MA

Kepada Yth.
 Tri Wahyuni Lestari
 Farmasi Universitas Indonesia
 Depok

LAPORAN HASIL UJI

Nomor Sertifikat : 01/ MA / SHU / I / 2015
 Nomor Pengujian : 01 / X / DISKER/ BIO/2015
 Halaman : 2 (dua)
 Tanggal Terbit : 20 Januari 2015

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian :

Contoh : Spirulina
 Jumlah contoh : 1 botol
 Keterangan contoh :
 Pengirim :
 Tanggal penerimaan contoh : 2 Januari 2015
 Tanggal pelaksanaan pengujian :
 Adalah sebagai berikut : Hasil Identifikasi terlampir

Cibinong, 20 Januari 2015,
 Plh. Deputi Administrasi,



Dra. Herlina Johan

(lanjutan)

LAPORAN HASIL IDENTIFIKASI (Konfirmasi)

Sampel : *Spirulina platensis*

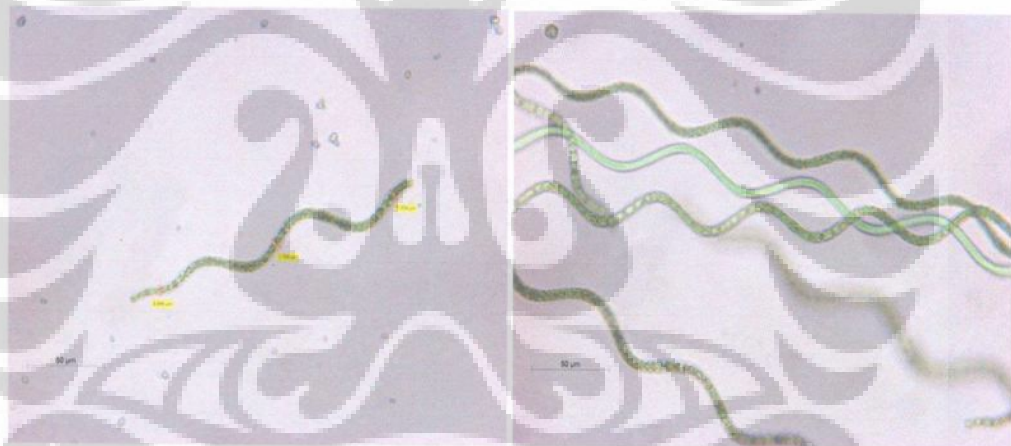
Pengirim: Ibu Tri (UI/Balitbang Kesehatan)

Hasil identifikasi:

Jenis alga : *Arthrospira platensis*

Karakteristik:

Trichome (filament) berbentuk silinder, panjang spiral teratur, bentuk sel melebar, kenampakan dinding antar sel, kehadiran pseudovacuola (dikonfirmasi dengan sifat tumbuh yang cenderung mengapung mengelompok di permukaan), diameter trichome 5 – 8 μm .



Acuan utama:

Drouet, F. 1959. Myxophyceae. In: Edmonson, W.T. (Ed.). Fresh Water Biology. 2nd edition. New York, John Willey & Sons: 95-114.

Cibinong, 19 Januari 2015

Peneliti:

Tjandra Chrismadha

[Signature]
17/1/15

Lampiran 4.Tabel persen parasitemia mencit selama infeksi *P.berghei*

No mencit	Parasitemia (%) Hari ke-					
	H3	H7	H10	H14	H21	H28
Kelompok I						
1	8	18	26	1	0	0
2	10	10	30	1.5	0	0
3	8	19	31	1	0	0
4	9	20	20	1.5	0	0
5	8	15	15	0.5	0	0
6	9	13	20	1	0	0
Rata-rata	9	15.8	23.6	1.08		
Kelompok II						
1	10	12	12	0.5	0	0
2	8	10	12	0.5	0	0
3	9	12	14	1	0	0
4	7	12	15	0.5	0	0
5	9	14	15	0.5	0	0
6	10	12	14	0.5	0	0
Rata-rata	9	12	13.6	0.58	0	0
Kelompok III						
1	8	8	8	0.5	0	0
2	8	9	10	0.5	0	0
3	10	12	12	0.5	0	0
4	9	10	10	0.5	0	0
5	8	10	12	1	0	0
6	10	7	14	0.5	0	0
Rata-rata	9	9.33	11	0.58	0	0
Kelompok IV						
1	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	2	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0
Rata-rata	2	0	0	0	0	0
Kelompok V						
1	8	25	50	70		
2	10	20	65	-		
3	10	25	45	72		
4	15	22	67	-		
5	14	27	65	-		
6	12	22	50	75		
Rata-rata	12	23.5	57	72.3		

Lampiran 5. Uji statistik persen parasitemia

Tabel Rata-rata dan Standar deviasi angka parasitemia

		Parasit_3	Parasit_7	Parasit_10	Parasit_15	Parasit_21	Parasit_28 * Klp_parasit
Klp_parasit		Parasit_3	Parasit_7	Parasit_10	Parasit_15	Parasit_21	Parasit_28
AP	Mean	8.6667	15.8333	23.6667	1.0833	.0000	.0000
	N	6	6	6	6	6	6
	Std.						
	Deviation	.81650	3.86868	6.34560	.37639	.00000	.00000
AP_ES	Mean	8.8333	12.0000	13.6667	.5833	.0000	.0000
	N	6	6	6	6	6	6
	Std.						
	Deviation	1.16905	1.26491	1.36626	.20412	.00000	.00000
AP_PS	Mean	8.8333	9.3333	11.0000	.5833	.0000	.0000
	N	6	6	6	6	6	6
	Std.						
	Deviation	.98319	1.75119	2.09762	.20412	.00000	.00000
DHP	Mean	1.6667	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000
	N	6	6	6	6	6	6
	Std.						
	Deviation	.51640	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
CMC	Mean	11.5000	23.5000	57.0000	72.3333		
	N	6	6	6	3		
	Std.						
	Deviation	2.66458	2.58844	9.69536	2.51661		
Total	Mean	7.9000	12.1333	21.0667	8.5370	.0000	.0000
	N	30	30	30	27	24	24
	Std.						
	Deviation	3.60412	8.13563	20.41793	22.99955	.00000	.00000

(lanjutan)

Uji normalitas persen parasitemia hari ke 3

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Parasit_3
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7.9000
	Std. Deviation	3.60412
Most Extreme Differences	Absolute	.278
	Positive	.180
	Negative	-.278
Test Statistic		.278
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Karena signifikansi $<0,05$, maka data parasitemia pada hari ke 3 tidak normal.

Uji homogenitas persen parasitemia pada hari ke 3

Test of Homogeneity of Variances			
Parasit_3			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.261	4	25	.001

Karena signifikansi $<0,05$, maka data tidak homogen.

(lanjutan)

Karena data persen parasitemia pada hari ke 3 tidak normal dan tidak homogen, maka digunakan uji non parametrik.

Uji non parametrik persen parasitemia hari ke 3

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Klp_parasit	N	Mean Rank
Parasit_3	AP	6	15.75
	AP_ES	6	17.08
	AP_PS	6	16.75
	DHP	6	3.50
	CMC	6	24.42
	Total	30	

Test Statistics ^{a,b}	
	Parasit_3
Chi-Square	18.321
df	4
Asymp. Sig.	.001

Karena signifikansi $<0,05$, berarti ada perbedaan yang signifikan persen parasitemia pada hari ke 3, maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney

Ringkasan Signifikansi Mann Whitney Test Parasitemia Hari ke 3

	AP	AP+ES	AP+PS	DHP	CMC
AP	-	-	-	-	-
AP+ES	0,669	-	-	-	-
AP+PS	0,818	0,937	-	-	-
DHP	0,02	0,02	0,02	-	-
CMC	0,041	0,065	0,065	0,02	-

Ket: Nilai $p \leq 0,05$ menunjukkan signifikansi

(lanjutan)

Uji normalitas persen parasitemia hari ke 10

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Parasit_10
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21.0667
	Std. Deviation	20.41793
Most Extreme Differences	Absolute	.250
	Positive	.250
	Negative	-.151
Test Statistic		.250
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Karena signifikansi $<0,05$, maka data parasitemia pada hari ke 10 tidak normal.

Uji homogenitas persen parasitemia pada hari ke 10

Test of Homogeneity of Variances			
Parasit_10			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
33.577	4	25	.000

Karena signifikansi $<0,05$, maka data parasitemia pada hari ke 10 tidak homogen.

Karena data persen parasitemia pada hari ke 10 tidak normal dan tidak homogen, maka digunakan uji non parametrik.

(lanjutan)

NPar Tests**Kruskal-Wallis Test**

Ranks			
	Klp_parasit	N	Mean Rank
Parasit_10	AP	6	21.33
	AP_ES	6	14.83
	AP_PS	6	10.33
	DHP	6	3.50
	CMC	6	27.50
	Total	30	

Test Statistics ^{a,b}	
	Parasit_10
Chi-Square	27.379
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Klp_parasit

Karena signifikansi $<0,05$, berarti ada perbedaan yang signifikan persen parasitemia pada hari ke 10, maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney

Ringkasan Signifikansi Mann Whitney Test Parasitemia Hari ke 10

	AP	AP+ES	AP+PS	DHP	CMC
AP	-	-	-	-	-
AP+ES	0,06	-	-	-	-
AP+PS	0,02	0,032	-	-	-
DHP	0,02	0,02	0,02	-	-
CMC	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Ket: Nilai $p \leq 0,05$ menunjukkan signifikansi

(lanjutan)

Uji normalitas persen parasitemia hari ke 15

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Parasit_15
N		27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8.5370
	Std. Deviation	22.99955
Most Extreme Differences	Absolute	.509
	Positive	.509
	Negative	-.355
Test Statistic		.509
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Karena signifikansi $<0,05$, maka data parasitemia pada hari ke 15 tidak normal.

Uji homogenitas persen parasitemia pada hari ke 15

Test of Homogeneity of Variances			
Parasit_15			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.247	4	22	.000

Karena signifikansi $<0,05$, maka data parasitemia pada hari ke 15 tidak homogen.

(lanjutan)

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Klp_parasit	N	Mean Rank
Parasit_15	AP	6	19.83
	AP_ES	6	13.33
	AP_PS	6	13.33
	DHP	6	3.50
	CMC	3	26.00
	Total	27	

Test Statistics ^{a,b}	
	Parasit_15
Chi-Square	22.585
df	4
Asymp. Sig.	.000

Karena signifikansi $<0,05$, berarti ada perbedaan yang signifikan persen parasitemia pada hari ke 15, maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney

Ringkasan Signifikansi Mann Whitney Test Parasitemia Hari ke 15

	AP	AP+ES	AP+PS	DHP	CMC
AP	-	-	-	-	-
AP+ES	0,041	-	-	-	-
AP+PS	0,041	1,00	-	-	-
DHP	0,02	0,02	0,02	-	-
CMC	0,024	0,024	0,024		

Ket: Nilai $p \leq 0,05$ menunjukkan signifikansi

Lampiran 6. Tabel jumlah sel darah merah mencit selama infeksi *P. berghei* ($\times 10^6$)

Mencit	Hari ke-		
	H3	H15	H21
Kelompok I			
1	10.5	5.5	10.4
2	9.79	6.2	10.5
3	9.29	5.06	11.2
Rata-rata	9.86	5.58	10.7
Kelompok II			
1	8.48	6.92	10.7
2	10.3	6.08	10.3
3	8.64	7.92	11.8
Rata-rata	9.14	6.97	10.93
Kelompok III			
1	9.31	8.96	11.8
2	9.28	7.18	11.8
3	9.68	7.42	9.38
Rata-rata	9.423333	7.853	10.99
Kelompok IV			
1	6.99	8.06	9.99
2	7.71	8.53	8.78
3	8.31	9.33	11.1
Rata-rata	7.67	8.64	9.95
Kelompok V			
1	6.01	4.27	10.4
2	6.29	4.1	10.5
3	5.97	4.67	11.2
Rata-rata	5.97	4.34	10.7

Lampiran 7. Tabel kadar Hb mencit (g/dl) selama infeksi *P. berghei*

Mencit	Hari ke-		
	H3	H15	H21
Kelompok I			
1	15.6	8.2	15.5
2	14.2	8.9	15.3
3	13.9	8.3	14.3
Rata-rata	14.56667	8.466667	15.03333
1	12.9	9.7	14.5
2	13.9	9.2	14.3
3	12.3	8.96	15.6
Rata-rata	13.03333	9.286667	14.8
1	13.2	13.4	15.6
2	14.3	11	15.6
3	12.8	11.2	13.8
Rata-rata	13.43333	11.86667	15
1	10.9	11.9	15.1
2	10.4	12.8	13.2
3	13.7	13.6	15
Rata-rata	11.66667	12.76667	14.43333
1	10.4	8.2	
2	10.6	7.1	
3	9.9	8.9	
Rata-rata	10.3	8.066667	

Lampiran 8. Uji statistik jumlah eritrosit dan hemoglobin

Tabel rata-rata dan standar deviasi jumlah eritrosit.

Report				
perlakuan		ERI_3	ERI_10	ERI_21
AP	Mean	9.8600	5.5867	10.7000
	N	3	3	3
	Std. Deviation	.60803	.57492	.43589
AP_ES	Mean	9.1400	6.9733	10.9333
	N	3	3	3
	Std. Deviation	1.00777	.92116	.77675
AP_PS	Mean	9.4233	7.8533	10.9933
	N	3	3	3
	Std. Deviation	.22279	.96588	1.39719
DHP	Mean	7.6700	8.6400	9.9567
	N	3	3	3
	Std. Deviation	.66091	.64211	1.16036
CMC	Mean	6.0900	4.3467	
	N	3	3	
	Std. Deviation	.17436	.29263	
Total	Mean	8.4367	6.6800	10.6458
	N	15	15	12
	Std. Deviation	1.52527	1.71240	.96426

(lanjutan)

Tabel rata-rata dan standar deviasi kadar Hb.

Report				
perlakuan		HB_3	HB_10	HB_21
AP	Mean	14.5667	8.4667	15.0333
	N	3	3	3
	Std. Deviation	.90738	.37859	.64291
AP_ES	Mean	13.0333	9.2867	14.8000
	N	3	3	3
	Std. Deviation	.80829	.37754	.70000
AP_PS	Mean	13.4333	11.8667	15.0000
	N	3	3	3
	Std. Deviation	.77675	1.33167	1.03923
DHP	Mean	11.6667	12.7667	14.4333
	N	3	3	3
	Std. Deviation	1.77858	.85049	1.06927
CMC	Mean	10.3000	8.0667	
	N	3	3	
	Std. Deviation	.36056	.90738	
Total	Mean	12.6000	10.0907	14.8167
	N	15	15	12
	Std. Deviation	1.76230	2.07534	.79411

(lanjutan)

Tabel uji normalitas data jumlah eritrosit dan kadar Hb

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	ERI_H3	HB_H3	ERI_H10	HB_H10	ERI_H21	HB_21
N		15	15	15	15	15	12	12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.0000	8.4367	12.6000	6.6800	10.0907	10.6458	14.8167
	Std. Deviation	1.46385	1.52527	1.76230	1.71240	2.07534	.96426	.79411
Most Extreme Differences	Absolute	.153	.177	.166	.099	.199	.134	.175
	Positive	.153	.120	.166	.095	.199	.116	.162
	Negative	-.153	-.177	-.145	-.099	-.114	-.134	-.175
Test Statistic		.153	.177	.166	.099	.199	.134	.175
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}	.111 ^c	.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ERI_H3	2.825	4	10	.083
HB_H3	3.046	4	10	.070
ERI_H10	1.103	4	10	.407
HB_H10	2.084	4	10	.158

Uji homogenitas data jumlah eritrosit dan Hb.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ERI_21	1.552	3	8	.275
HB_21	.993	3	8	.444

(lanjutan)

Karena data jumlah eritrosit normal dan homogen (signifikansi $>0,05$) maka data normal dan homogen, dan dilanjutkan dengan uji Anova.

Uji anova jumlah eritrosit dan Hb

Tujuan : Mengetahui adanya perbedaan bermakna jumlah eritrosit masing-masing pada hari ke 3, 10 dan 21

Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna antara jumlah eritrosit masing-masing pada hari ke 3, 10 dan 21

H_1 = Terdapat perbedaan bermakna antara jumlah eritrosit masing-masing pada hari ke 3, 10 dan 21

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

H_0 diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Hasil : pada halaman selanjtnya

(lanjutan)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ERI_H3	Between Groups	28.766	4	7.192	18.904	.000
	Within Groups	3.804	10	.380		
	Total	32.570	14			
HB_H3	Between Groups	32.733	4	8.183	7.615	.004
	Within Groups	10.747	10	1.075		
	Total	43.480	14			
ERI_H10	Between Groups	35.833	4	8.958	17.162	.000
	Within Groups	5.220	10	.522		
	Total	41.052	14			
HB_H10	Between Groups	53.087	4	13.272	18.403	.000
	Within Groups	7.212	10	.721		
	Total	60.298	14			

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ERI_H21	Between Groups	2.044	3	.681	.666	.596
	Within Groups	8.184	8	1.023		
	Total	10.228	11			
HB_21	Between Groups	.683	3	.228	.291	.831
	Within Groups	6.253	8	.782		
	Total	6.937	11			

Hasil : Jumlah eritrosit dan Hb pada hari ke 3 dan 10 menunjukkan $\alpha < 0,05$, maka terdapat perbedaan bermakna jumlah eritrosit dan Hb masing-masing pada hari ke 3 dan 10

: Jumlah eritrosit dan Hb pada hari ke 21 menunjukkan $\alpha > 0,05$, maka terdapat tidak perbedaan bermakna jumlah eritrosit dan Hb pada hari ke 21

(lanjutan)

Uji anova jumlah eritrosit pada hari ke 3

Tujuan : Mengetahui adanya perbedaan bermakna jumlah eritrosit antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah eritrosit antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

H_1 = Terdapat perbedaan bermakna jumlah eritrosit antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
 H_0 diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Hasil : pada halaman selanjutnya

(lanjutan)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ERI_H3

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
AP	AP_ES	.72000	.50360	.183	-.4021	1.8421
	AP_PS	.43667	.50360	.406	-.6854	1.5588
	DHP	2.19000*	.50360	.001	1.0679	3.3121
	CMC	3.77000*	.50360	.000	2.6479	4.8921
AP_ES	AP	-.72000	.50360	.183	-1.8421	.4021
	AP_PS	-.28333	.50360	.586	-1.4054	.8388
	DHP	1.47000*	.50360	.015	.3479	2.5921
	CMC	3.05000*	.50360	.000	1.9279	4.1721
AP_PS	AP	-.43667	.50360	.406	-1.5588	.6854
	AP_ES	.28333	.50360	.586	-.8388	1.4054
	DHP	1.75333*	.50360	.006	.6312	2.8754
	CMC	3.33333*	.50360	.000	2.2112	4.4554
DHP	AP	-2.19000*	.50360	.001	-3.3121	-1.0679
	AP_ES	-1.47000*	.50360	.015	-2.5921	-.3479
	AP_PS	-1.75333*	.50360	.006	-2.8754	-.6312
	CMC	1.58000*	.50360	.011	.4579	2.7021
CMC	AP	-3.77000*	.50360	.000	-4.8921	-2.6479
	AP_ES	-3.05000*	.50360	.000	-4.1721	-1.9279
	AP_PS	-3.33333*	.50360	.000	-4.4554	-2.2112
	DHP	-1.58000*	.50360	.011	-2.7021	-.4579

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(lanjutan)

Uji anova kadar Hb pada hari ke 3

Tujuan : Mengetahui adanya perbedaan bermakna kadar Hb antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna kadar Hb antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

H_1 = Terdapat perbedaan bermakna kadar Hb antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
 H_0 diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Hasil : pada halaman selanjutnya

(lanjutan)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HB_H3

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
AP	AP_ES	1.53333	.84643	.100	-.3526	3.4193
	AP_PS	1.13333	.84643	.210	-.7526	3.0193
	DHP	2.90000*	.84643	.006	1.0140	4.7860
	CMC	4.26667*	.84643	.001	2.3807	6.1526
AP_ES	AP	-1.53333	.84643	.100	-3.4193	.3526
	AP_PS	-.40000	.84643	.647	-2.2860	1.4860
	DHP	1.36667	.84643	.137	-.32526	3.0526
	CMC	2.73333*	.84643	.009	.8474	4.6193
AP_PS	AP	-1.13333	.84643	.210	-3.0193	.7526
	AP_ES	.40000	.84643	.647	-1.4860	2.2860
	DHP	1.76667	.84643	.063	-.1193	3.6526
	CMC	3.13333*	.84643	.004	1.2474	5.0193
DHP	AP	-2.90000*	.84643	.006	-4.7860	-1.0140
	AP_ES	-1.36667	.84643	.137	-3.2526	.5193
	AP_PS	-1.76667	.84643	.063	-3.6526	.1193
	CMC	1.36667	.84643	.137	-.5193	3.2526
CMC	AP	-4.26667*	.84643	.001	-6.1526	-2.3807
	AP_ES	-2.73333*	.84643	.009	-4.6193	-.8474
	AP_PS	-3.13333*	.84643	.004	-5.0193	-1.2474
	DHP	-1.36667	.84643	.137	-3.2526	.5193

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(lanjutan)

Uji anova jumlah eritrosit pada hari ke 10

Tujuan : Mengetahui adanya perbedaan bermakna jumlah eritrosit antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah eritrosit antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

H_1 = Terdapat perbedaan bermakna jumlah eritrosit antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
 H_0 diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Hasil : pada halaman selanjutnya

(lanjutan)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ERI_H10

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
AP	AP_ES	-1.38667*	.58991	.041	-2.7011	-.0723
	AP_PS	-2.26667*	.58991	.003	-3.5811	-.9523
	DHP	-3.05333*	.58991	.000	-4.3677	-1.7389
	CMC	1.24000	.58991	.062	-.0744	2.5544
AP_ES	AP	1.38667*	.58991	.041	.0723	2.7011
	AP_PS	-.88000	.58991	.167	-2.1944	.4344
	DHP	-1.66667*	.58991	.018	-2.9811	-.3523
	CMC	2.62667*	.58991	.001	1.3123	3.9411
AP_PS	AP	2.26667*	.58991	.003	.9523	3.5811
	AP_ES	.88000	.58991	.167	-.4344	2.1944
	DHP	-.78667	.58991	.212	-2.1011	.5277
	CMC	3.50667*	.58991	.000	2.1923	4.8211
DHP	AP	3.05333*	.58991	.000	1.7389	4.3677
	AP_ES	1.66667*	.58991	.018	.3523	2.9811
	AP_PS	.78667	.58991	.212	-.5277	2.1011
	CMC	4.29333*	.58991	.000	2.9789	5.6077
CMC	AP	-1.24000	.58991	.062	-2.5544	.0744
	AP_ES	-2.62667*	.58991	.001	-3.9411	-1.3123
	AP_PS	-3.50667*	.58991	.000	-4.8211	-2.1923
	DHP	-4.29333*	.58991	.000	-5.6077	-2.9789

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(lanjutan)

Uji anova kadar Hb pada hari ke 10

Tujuan : Mengetahui adanya perbedaan bermakna kadar Hb antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna kadar Hb antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

H_1 = Terdapat perbedaan bermakna kadar Hb antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
 H_0 diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Hasil : pada halaman selanjutnya

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HB_H10

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
AP	AP_ES	-.82000	.69338	.264	-2.3650	.7250
	AP_PS	-3.40000*	.69338	.001	-4.9450	-1.8550
	DHP	-4.30000*	.69338	.000	-5.8450	-2.7550
	CMC	.40000	.69338	.577	-1.1450	1.9450
AP_ES	AP	.82000	.69338	.264	-.7250	2.3650
	AP_PS	-2.58000*	.69338	.004	-4.1250	-1.0350
	DHP	-3.48000*	.69338	.001	-5.0250	-1.9350
	CMC	1.22000	.69338	.109	-.3250	2.7650
AP_PS	AP	3.40000*	.69338	.001	1.8550	4.9450
	AP_ES	2.58000	.69338	.004	1.0350	4.1250
	DHP	-.90000	.69338	.223	-2.4450	.6450
	CMC	3.80000*	.69338	.000	2.2550	5.3450
DHP	AP	4.30000*	.69338	.000	2.7550	5.8450
	AP_ES	3.48000*	.69338	.001	1.9350	5.0250
	AP_PS	.90000	.69338	.223	-.6450	2.4450
	CMC	4.70000*	.69338	.000	3.1550	6.2450
CMC	AP	-.40000	.69338	.577	-1.9450	1.1450
	AP_ES	-1.22000	.69338	.109	-2.7650	.3250
	AP_PS	-3.80000*	.69338	.000	-5.3450	-2.2550
	DHP	-4.70000*	.69338	.000	-6.2450	-3.1550

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(lanjutan)

Ringkasan signifikansi jumlah eritrosit antar kelompok pada hari ke3,10 dan 21

Hari ke-	Jumlah Eritrosit x 10 ⁶				
	AP ±SD	(AP+ES) ±SD	(AP+PS) ±SD	DHP ±SD	CMC ±SD
3	9.86 ^{ad} ±0.608	9.14 ^d ±1.007	9.4233 ^d ±0.222	7.67 ^b ±0.660	6.09 ^c ±0.174
10	5.58 ^a ±0.574	6.97 ^c ±0.921	7.85 ^{cd} ±0.965	8.64 ^d ±0.642	4.34 ^{ab} ±0.292
21	10.7 ^a ±0.435	10.9333 ^a ±0.776	10.9933 ^a ±1.397	9.9567 ^a ±1.160	

Ket: Huruf yang berbeda pada lajur yang sama menyatakan perbedaan yang signifikan

Ringkasan signifikansi kadar hemoglobin antar kelompok pada hari ke 3,10 dan 21

Hari ke-	Nilai Hemoglobin (g/dl)				
	AP ±SD	(AP+ES) ±SD	(AP+PS) ±SD	DHP ±SD	CMC ±SD
3	14.56 ^a ±0.907	13.03 ^{ac} ±0.808	13.4 ^{ac} ±0.776	11.6 ^c ±1.778	10.30 ^c ±0.360
10	8.46 ^a ±0.378	9.28 ^b ±0.377	11.86 ^{bc} ±1.331	12.76 ^{cd} ±0.850	8.06 ^a ±0.907
21	15.03 ^a ±0.642	14.80 ^a ±0.700	15.00 ^a ±1.039	14.43 ^a ±1.069	

Ket: Huruf yang berbeda pada lajur yang sama menyatakan perbedaan yang signifikan

Lampiran 9. Persen apoptosis sel limpa

Tabel apoptosis sel limpa hari ke 3

Kelompok		Hari ke 3											
perlakuan		Lapang pandang											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Jumlah sel	persen
AP	3	328	344	283	317	321	269	284	274	293	320	3033	0.0026
Sel apoptosis		1	1	2	0	0	1	0	1	2	0	8	
	10	243	372	343	315	385	298	310	308	373	303	3250	0.0021
		0	0	1	0	0	1	1	0	1	3	7	
	21	462	235	334	262	432	368	318	279	359	419	3257	0.0012
		1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
AP_ES	3	312	204	334	217	287	298	315	284	276	286	2813	0.003
Sel apoptosis		0	3	2	1	1	0	1	1	0	1	10	
	10	269	321	264	296	189	220	279	220	272	362	2692	0.002
		0	0	1	2	2	0	0	0	1	0	6	
	21	378	329	209	267	274	345	286	282	315	289	2974	0.001
		1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	
AP_PS	3	376	365	278	298	175	356	365	354	320	336	3223	0.0009
Sel apoptosis		0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	3	
	10	270	265	243	202	179	320	345	347	335	342	2848	0.0017
		1	0	0	1	3	0	0	0	0	0	5	
	21	270	276	265	278	262	280	283	273	282	295	2764	0.001
		0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3	

(Lanjutan)													
DHP	3	294	320	334	315	298	332	343	325	346	343	3250	0.0015
Sel apoptosis		1	1	0		0	0	1	2	0	0	5	
	10	424	368	354	363	360	348	347	320	356	362	3602	0.0019
		1	1	0	1	0	2	0	1	0	1	7	
	21	432	272	320	334	276	344	363	368	363	382	3454	0.0011
		0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	4	
CMC	3	235	264	243	335	267	243	262	287	264	278	2678	0.007
Sel apoptosis		3	1	4	0	1	1	3	0	2	4	19	
	10	281	274	284	235	263	284	320	334	320	323	2918	0.007
		3	3	0	5	6	0	1	1	1	2	22	
	21	264	285	297	321	274	282	306	267	274	278	2848	0.007
		2	1	3	2	1	4	3	2	1	2	21	

Tabel apoptosis sel limpa pada hari ke 10

Hari ke 10													
Lapang pandang jml sel												persen	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
AP	3	222	238	232	228	245	250	235	225	230	236	2341	0.011
Sel apoptosis		3	3	3	3	2	2	2	3	2	3	26	
	10	305	320	333	268	284	278	284	284	273	274	2903	0.009
		2	2	1	3	2	6	4	2	2	3	27	
	21	237	383	272	368	374	268	278	384	285	320	3169	0.006
		3	0	6	3	0	4	2	2	0	2	22	
AP_ES	3	330	343	276	280	286	283	343	361	340	278	3120	0.009
Sel apoptosis		3	1	4	1	5	4	3	2	1	5	29	
	10	329	323	235	323	263	278	320	286	293	280	2930	0.009
		2	4	4	1	2	4	1	3	4	3	28	
	21	79	157	240	280	276	306	294	270	243	196	2341	0.005
		1	1	1	1	3	1	1	0	1	3	13	
AP_PS	3	369	343	356	286	343	320	228	364	320	284	3213	0.009
Sel apoptosis		2	2	3	3	0	3	4	5	4	4	30	
	10	265	286	267	264	282	320	324	263	272	284	2827	0.005
		1	4	2	2	1	0	2	2	1	0	15	
	21	282	264	254	267	264	232	286	294	274	278	2695	0.004
		1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	13	

(Lanjutan)

DHP		320	324	314	327	330	332	321	298	295	304	3165	0.0003
Sel apoptosis	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
		287	278	285	264	289	268	245	255	287	263	2721	0.0003
	10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
		341	317	407	317	315	327	297	289	283	285	3178	0.0003
	21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
CMC	3	308	220	262	172	224	220	243	260	242	234	2385	0.015
Sel apoptosis		2	2	3	3	3	3	2	4	5	9	36	
	10	347	320	209	236	304	329	211	228	240	235	2659	0.018
		2	2	6	5	8	6	5	4	6	5	49	
	21	346	358	342	328	292	284	276	324	280	246	3076	0.018
		3	3	8	7	5	4	6	6	8	7	57	

Tabel apoptosis sel limpa hari ke 21

		Hari ke 21											
		Lapang pandang										jml sel	persen
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
AP	3	416	420	404	403	416	413	440	412	403	423	4150	0.003
Sel apoptosis		3	1	2	1	3	2	0	0	2	0	14	
	10	432	419	405	428	416	403	417	423	405	418	4166	0.002
		2	1	1	2	1	0	0	1	1	0	9	
	21	380	378	423	268	368	364	382	328	365	355	3611	0.001
		1	0	2	0	0	1	0	0	1	0	5	
AP_ES	3	428	416	423	412	424	386	437	418	432	440	4216	0.001
Sel apoptosis		2	1	1	0	1	0	0	3	0	0	8	
	10	365	380	278	264	391	284	382	262	264	404	3274	0.001
		0	0	1	0	0	0	0	2	2	0	5	
	21	354	338	346	357	368	362	347	359	324	321	3476	0.001
		0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	4	
AP_PS	3	268	286	306	315	328	317	305	295	304	312	3036	0.0003
Sel apoptosis		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	10	433	360	420	384	378	346	406	387	364	380	3858	0.0005
		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	
	21	424	435	424	385	396	406	421	397	405	421	4114	0.0002
		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	

(lanjutan)													
DHP	3	344	326	320	312	306	343	324	282	341	288	3186	0.0006
Sel apoptosis		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	
	10	282	386	329	310	305	313	305	406	365	386	3387	0.0005
		0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	
	21	328	364	332	278	323	386	403	278	362	430	3484	0.0005
		0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	



Lampiran 10. Uji statistik persen apoptosis

Uji homogenitas persen apoptosis pada hari ke 3

Test of Homogeneity of Variances

Apop_3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.839	4	10	.198

Uji normalitas persen apoptosis pada hari ke 3

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Apop_3
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00273
	Std. Deviation	.002288
Most Extreme Differences	Absolute	.276
	Positive	.276
	Negative	-.212
Test Statistic		.276
Asymp. Sig. (2-tailed)		.003 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Karena nilai signifikansi uji homogenitas $>0,05$, dan nilai signifikansi uji normalitas $<0,05$, maka persen apoptosis pada hari ke 3 homogen namun tidak normal.

Oleh karena analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik

(lanjutan)

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	perlakuan	N	Mean Rank
Apop_3	AP	3	8.67
	AP_ES	3	7.83
	AP_PS	3	3.50
	DHP	3	6.00
	CMC	3	14.00
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Apop_3
Chi-Square	9.190
df	4
Asymp. Sig.	.057

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
perlakuan

Karena nilai signifikansi $>0,05$ maka tidak terdapat perbedaan persen apoptosis antar kelompok perlakuan pada hari ke 3

(lanjutan)

Uji statistik persen apoptosis pada hari ke 10

Test of Homogeneity of Variances

Apop_10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.779	4	10	.087

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Apop_10
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00787
	Std. Deviation	.005927
Most Extreme Differences	Absolute	.158
	Positive	.158
	Negative	-.109
Test Statistic		.158
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Karena nilai signifikansi uji homogenitas $<0,05$, dan nilai signifikansi uji normalitas $<0,05$, maka data persen apoptosis pada hari ke 10 homogen dan normal.

Oleh karena analisis dilanjutkan dengan uji anova

Uji anova persen apoptosis pada hari ke 10

Tujuan : Mengetahui adanya perbedaan bermakna persen apoptosis antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

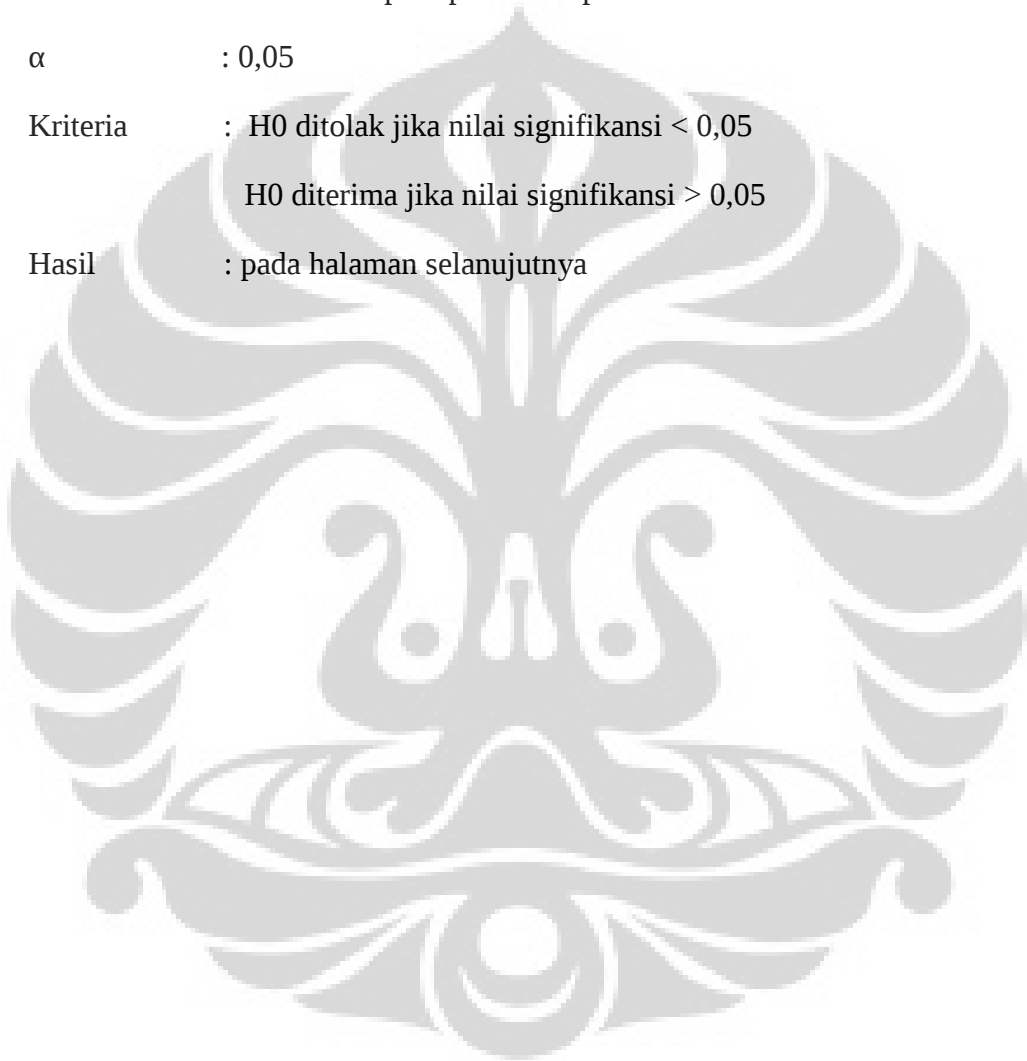
Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna persen apoptosis antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

H_1 = Terdapat perbedaan bermakna persen apoptosis antar kelompok perlakuan pada hari ke 10

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
 H_0 diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Hasil : pada halaman selanjutnya



Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apop_10

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
AP	AP_ES	.001000	.001700	.569	-.00279	.00479
	AP_PS	.002667	.001700	.148	-.00112	.00645
	DHP	.008667*	.001700	.000	.00488	.01245
	CMC	-.008333*	.001700	.001	-.01212	-.00455
AP_ES	AP	-.001000	.001700	.569	-.00479	.00279
	AP_PS	.001667	.001700	.350	-.00212	.00545
	DHP	.007667*	.001700	.001	.00388	.01145
	CMC	-.009333*	.001700	.000	-.01312	-.00555
AP_PS	AP	-.002667	.001700	.148	-.00645	.00112
	AP_ES	-.001667	.001700	.350	-.00545	.00212
	DHP	.006000*	.001700	.005	.00221	.00979
	CMC	-.011000*	.001700	.000	-.01479	-.00721
DHP	AP	-.008667*	.001700	.000	-.01245	-.00488
	AP_ES	-.007667*	.001700	.001	-.01145	-.00388
	AP_PS	-.006000*	.001700	.005	-.00979	-.00221
	CMC	-.017000*	.001700	.000	-.02079	-.01321
CMC	AP	.008333*	.001700	.001	.00455	.01212
	AP_ES	.009333*	.001700	.000	.00555	.01312
	AP_PS	.011000*	.001700	.000	.00721	.01479
	DHP	.017000*	.001700	.000	.01321	.02079

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(lanjutan)

Uji statistik persen apoptosis hari ke 21

Test of Homogeneity of Variances

Apop_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.424	3	8	.073

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Apop_21
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00097
	Std. Deviation	.000799
Most Extreme Differences	Absolute	.317
	Positive	.317
	Negative	-.169
Test Statistic		.317
Asymp. Sig. (2-tailed)		.002 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Karena nilai signifikansi uji homogenitas $>0,05$, dan nilai signifikansi uji normalitas $<0,05$, maka data apoptosis pada hari ke 21 homogen namun tidak normal.

Oleh karena analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik

(lanjutan)

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Klp_parasit	N	Mean Rank
Apop_21	AP	6	9.50
	AP_ES	6	3.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}	
	Apop_21
Chi-Square	8.735
df	1
Asymp. Sig.	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Klp_parasit

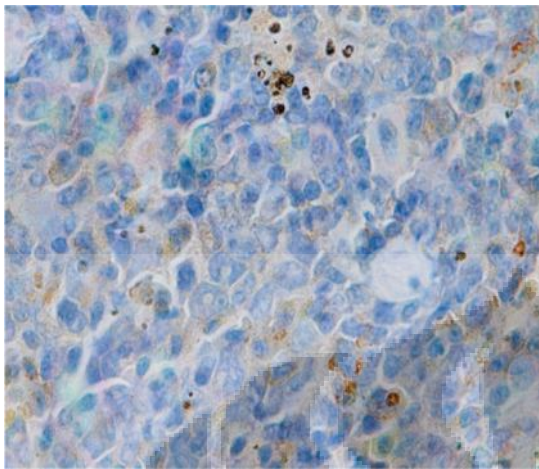
Karena signifikansi $< 0,05$, maka terdapat perbedaan bermakna persen apoptosis antar kelompok pada hari ke 15. Analisis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

Ringkasan signifikansi uji Mann Whitney persen apoptosis hari ke 15

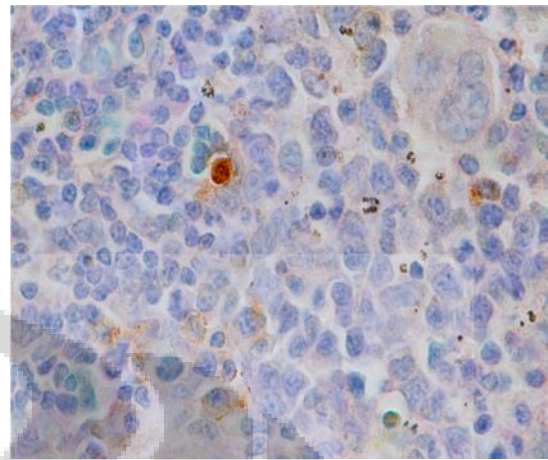
	AP	AP+ES	AP+PS	DHP
AP	-	-	-	-
AP+ES	0,2	-	-	-
AP+PS	0,1	0,1	-	-
DHP	0,1	0,1	0,2	-

Ket: Nilai $\alpha \leq 0,05$ menunjukkan signifikansi

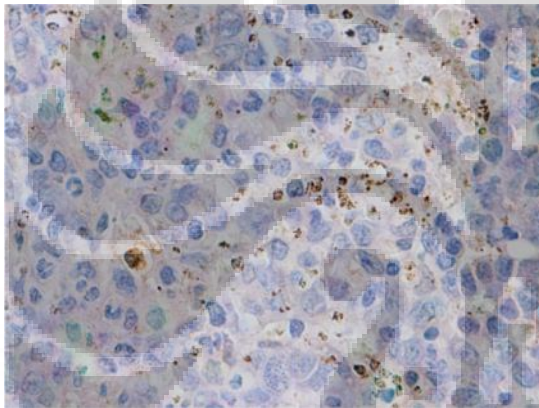
Lampiran 7. Gambar hasil pewarnaan IHK pada jaringan limpa mencit dengan antibodi primer anticaspase 3 pada hari ke 3



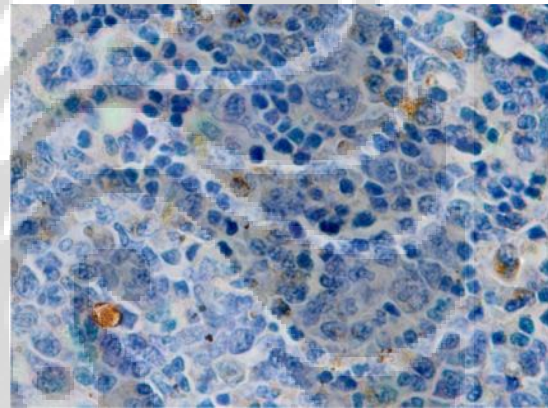
Kelompok AP hari ke 3



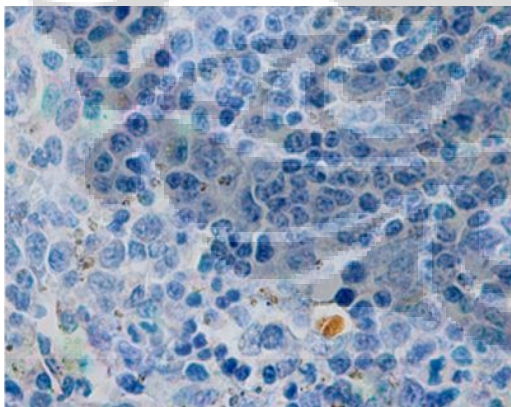
Kelompok AP+ES hari ke 3



Kelompok AP+PS hari ke 3

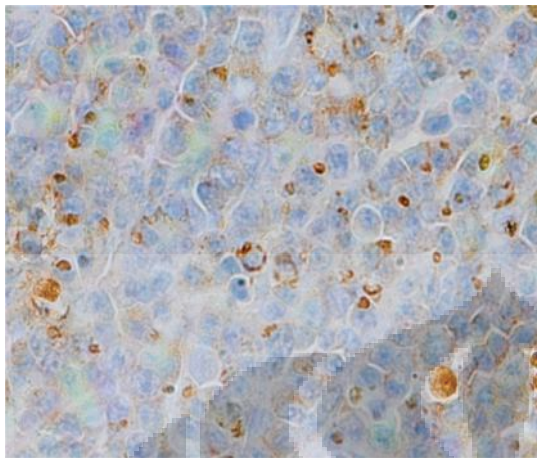


Kelompok DHP hari ke 3

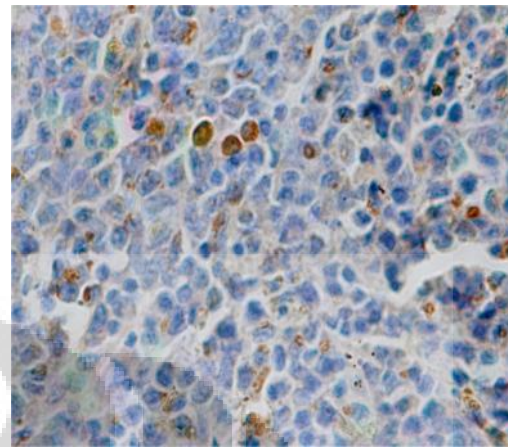


Kelompok CMC hari ke 3

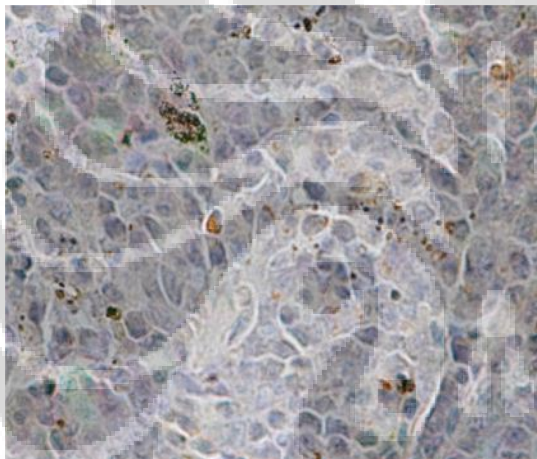
Lampiran 8. Gambar hasil pewarnaan IHK pada jaringan limpa mencit dengan antibodi primer anticaspase 3 pada hari ke 10



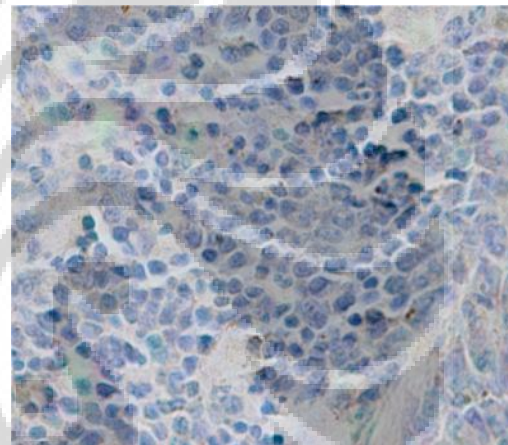
Kelompok AP hari ke 10



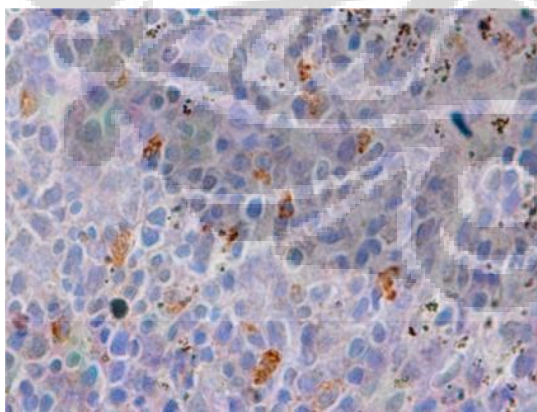
Kelompok AP+ES hari ke 10



Kelompok AP+PS hari ke 10

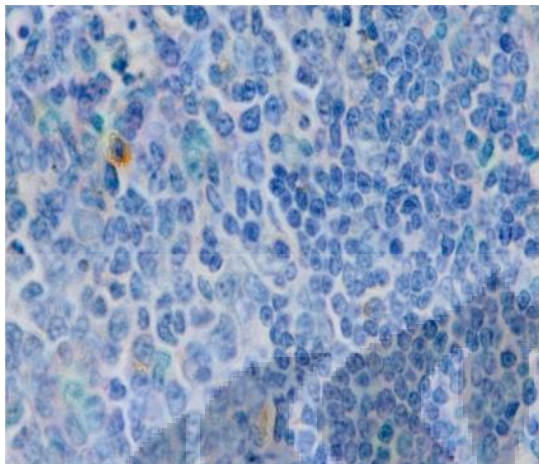


Kelompok DHP hari ke 10

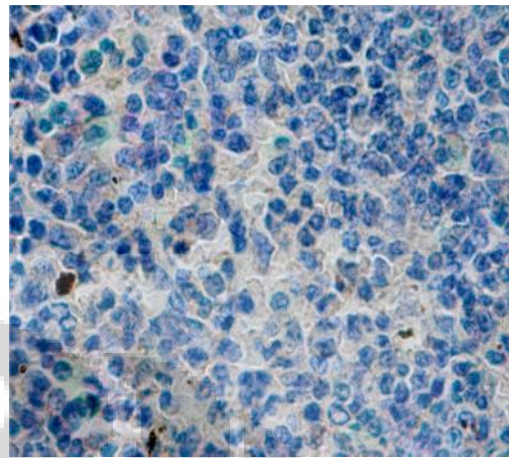


Kelompok CMC hari ke 10

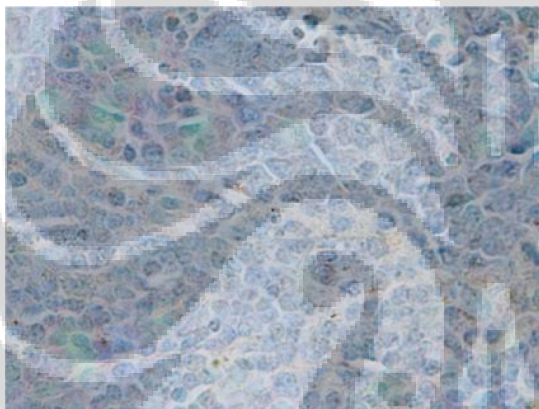
Lampiran 9. Gambar hasil pewarnaan IHK pada jaringan limpa mencit dengan antibodi primer anticaspase 3 pada hari ke 21



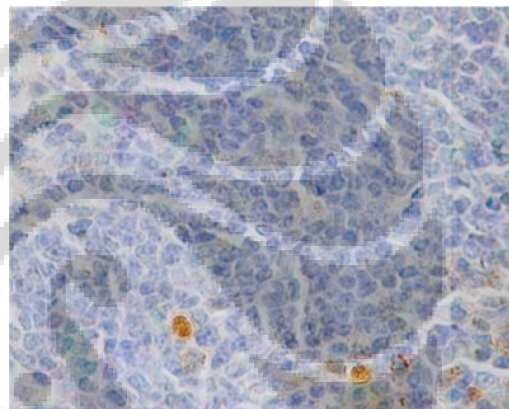
Kelompok AP hari ke 21



Kelompok AP+ES hari ke 21



Kelompok AP+PS hari ke 21



Kelompok DHP hari ke 21

Lampiran 14. Perhitungan kadar andrografolid dalam sambiloto secara HPLC

Bobot ekstrak = 0,1012 g

Konsentrasi standar = 35 ppm.

Luas area sampel = 808060

Luas area standar = 3366603

Volume labu = 50 mL

Faktor pengenceran (fp)= 20 x

Kandungan andrografolid dalam sampel dihitung dengan rumus:

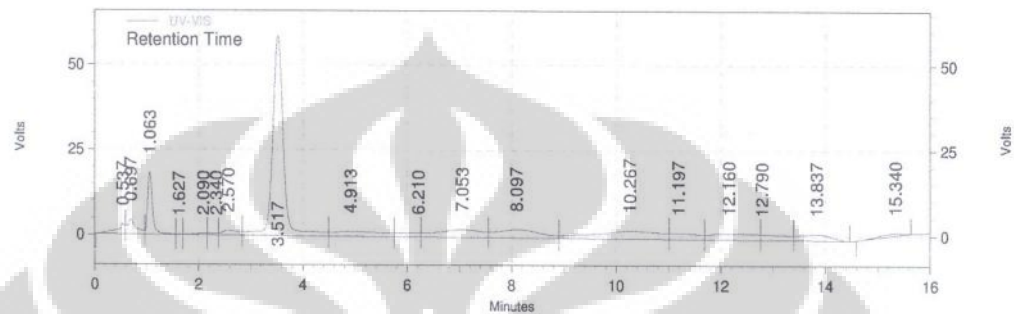
$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{area sampel} / \text{area standar} \times [\text{konsentrasi standar}] \times \text{volume labu} \times \text{fp}}{\text{bobot sampel (gram)} \times 1000} \\
 &= \frac{808060 / 3366603 \times [35 \text{ ppm}] \times 50 \text{ ml} \times 20}{0,1012 (\text{gram}) \times 1000} \\
 &= 83,012 \text{ mg/gram} \\
 &= 8,301 \%
 \end{aligned}$$

(lanjutan)

Page 1 of 1

Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\androgapolide\2014\22 12 14\STD ANDRO 35 ppm.dat
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\androgapolide\androgapolide npholana 52.5 meoh 47.5
 air merck .met
 Acquired: 12/22/2014 3:14:16 PM
 Printed: 12/24/2014 6:17:29 PM

**UV-VIS Results**

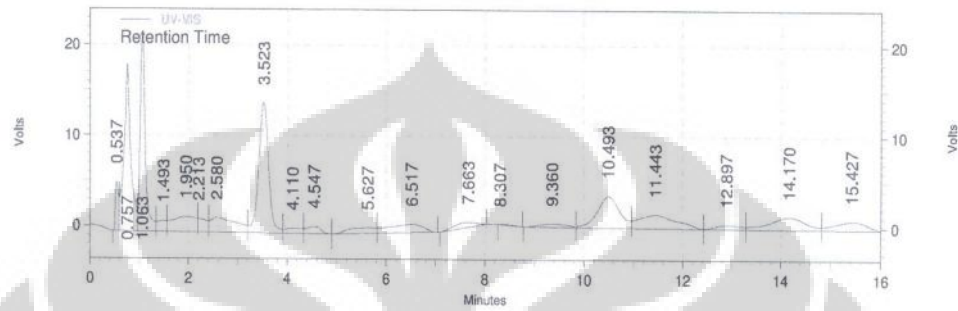
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.537	124671	1.56	11583	2.81
0.697	193981	2.43	16750	4.06
1.063	459528	5.75	72277	17.54
1.627	499	0.01	83	0.02
2.090	23112	0.29	1622	0.39
2.340	21375	0.27	1891	0.46
2.570	106732	1.34	5160	1.25
3.517	3366603	42.15	235094	57.04
4.913	354790	4.44	5521	1.34
6.210	133794	1.68	4681	1.14
7.053	529697	6.63	8873	2.15
8.097	550537	6.89	9357	2.27
10.267	811746	10.16	8939	2.17
11.197	259043	3.24	6950	1.69
12.160	428462	5.36	7356	1.78
12.790	227679	2.85	6410	1.56
13.837	302480	3.79	7072	1.72
15.340	92308	1.16	2523	0.61
Totals	7987037	100.00	412142	100.00

(lanjutan)

Area % Report

Page 1 of 1

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\androgapolide\2014\22 12 14\98 XII 14 01.dat
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\androgapolide\androgapolide npholana 52.5 meoh 47.5
 air merck .met
 Acquired: 12/22/2014 3:52:31 PM
 Printed: 12/24/2014 6:16:58 PM

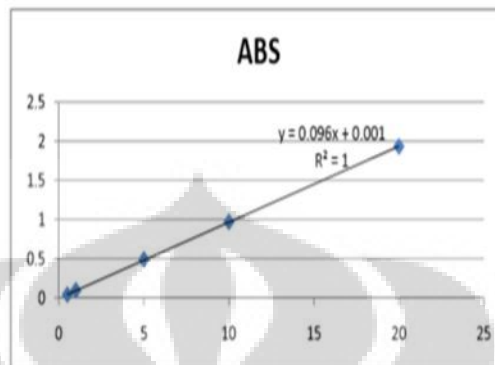
**UV-VIS Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.537	94730	2.04	21663	6.98
0.757	711839	15.32	73680	23.73
1.063	635980	13.68	87384	28.14
1.493	59643	1.28	4872	1.57
1.950	224386	4.83	6644	2.14
2.213	73378	1.58	5876	1.89
2.580	236498	5.09	6500	2.09
3.523	808060	17.39	57602	18.55
4.110	52944	1.14	2332	0.75
4.547	63835	1.37	3263	1.05
5.627	97662	2.10	2554	0.82
6.517	182168	3.92	3638	1.17
7.663	72380	1.56	2222	0.72
8.307	5383	0.12	114	0.04
9.360	59234	1.27	1528	0.49
10.493	434922	9.36	13825	4.45
11.443	316260	6.80	5854	1.89
12.897	63630	1.37	1760	0.57
14.170	282418	6.08	5390	1.74
15.427	172344	3.71	3809	1.23
Totals	4647694	100.00	310510	100.00

Lampiran 15. Perhitungan kadar flavonoid

a. Perhitungan kadar flavonoid dalam powder spirulina

konsentrasi ppm	ABS
0.5	0.043
1	0.099
5	0.493
10	0.974
20	1.936



Nama Sample	kode sample	bobot sample (g)	abs	a	b	kadar flavanoid (ppm)	fp	vol (ml)	kadar flavanoid (%b/b)	Rendemen	kadar flavanoid (%b/b)
Powder Spiru (sudah Ekstrak)	59/IV/15	0.286	0.812	0.0969	0.0018	8.361197	6.25	100	1.827184683	5.690863	0.103983

Dari kurva kalibrasi didapat persamaan

$$y = 0,096 x + 0,001$$

y = Absorbansi; x = konsentrasi

bila y = 0,812 maka x = 8,36

$$\% \text{ b/b ekstrak} = \frac{\text{abs}}{\text{a}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,812}{0,0969} = 1,827 \% \text{ b/b}$$

$$\% \text{ b/b sampel} = \frac{\text{bobot sampel}}{\text{fp}} \times 100\% = 0,103\% \text{ b/b}$$

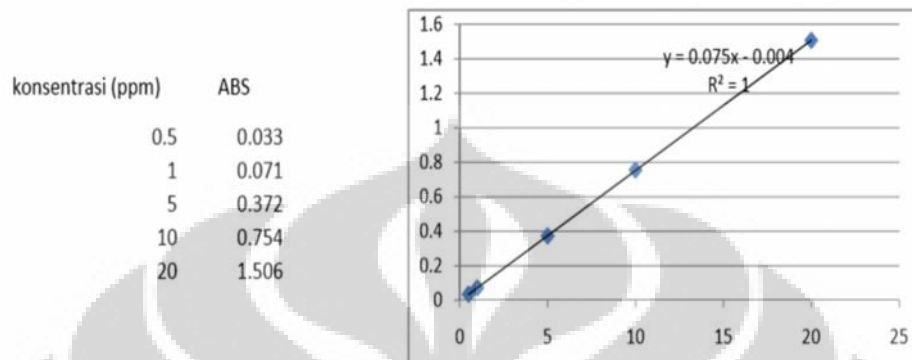
sampel

Jadi kadar flavonoid dalam powder spirulina adalah 0,103 % b/b dihitung sebagai kuersetin

b. Perhitungan kadar flavonoid ekstrak spirulina

Ekstraksi sampel powder spiru

Kode	Bobot simplisia	B kosong	B k + sampel	B ekstrak	Rendeme n
59/IV/15	5.0256	37.9157	38.2017	0.286	5.690863



Nama Sample	kode sample	bobot sample (g)	abs	a	b	kadar flavanoid (ppm)	fp	vol (ml)	kadar flavanoid (%b/b)
Ekstrak Spiru	58/IV/15	0.3026	0.231	0.0756	-0.0045	3.115079	6.25	100	0.643398745

Dari kurva kalibrasi didapat persamaan

$$y = 0,075 x + 0,004$$

y = Absorbansi; x = konsentrasi

bila y = 0,231 maka x = 3,026

$$\% \text{ b/b} = \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{---}}{\text{---}} = 0,643 \% \text{ b/b}$$

Jadi kadar flavonoid dalam ekstrak spirulina adalah 0,643 % b/b dihitung sebagai kuersetin

Lampiran 16. Contoh perhitungan dosis suspensi ekstrak

Perhitungan ini didasarkan pada dosis sub kronik ekstrak sambiloto dan spirulina yang aman untuk digunakan pada mencit serta berkhasiat antimalaria.

Dalam penelitian ini digunakan dosis ekstrak sambiloto 200 mg/Kg BB atau 5 mg/25 g BB.

Pembuatan suspensi ekstrak untuk 50 mencit.

Volume yang akan diberikan adalah 0,4 ml/25 g BB.

Jumlah ekstrak sambiloto yaitu $5 \text{ mg} \times 50 \text{ ekor} = 250 \text{ mg}$.

Volume akuades yang dibutuhkan adalah $0,4 \text{ ml} \times 50 \text{ ekor} = 20 \text{ ml}$.

Dilarutkan dalam CMC 0,5% (100 mg/20ml)

Jadi untuk membuat suspensi ekstrak sambiloto yang dibutuhkan untuk 50 ekor mencit.

250 mg ekstrak sambiloto ditambah 100 mg CMC kemudian diberi sedikit akuades untuk digerus sehingga menjadi pasta, setelah itu dimasukkan sisa akuades, digerus sehingga dihasilkan suspensi ekstrak etanol sambiloto.

Suspensi ekstrak sambiloto yang telah dibuat dibagi menjadi 3 bagian: untuk kelompok AP, AP+ES dan AP+PS, masing-masing sekitar 7 ml suspensi.

Perhitungan dosis powder spirulina (*Arthrospira platensis*)

Dosis powder spirulina 130 mg/kg BB atau 3,25 mg/25 g BB.

Untuk 7 ml suspensi ekstrak sambiloto, maka powder spirulina yang ditambahkan adalah

$$(7 \text{ ml} : 0,4 \text{ ml}) \times 3,25 \text{ mg} = 56,87 \text{ mg}$$

Maka untuk 17 ekor mencit, ditimbang sebanyak 56,87 mg dan dicampurkan ke dalam 7 ml suspensi sambiloto.

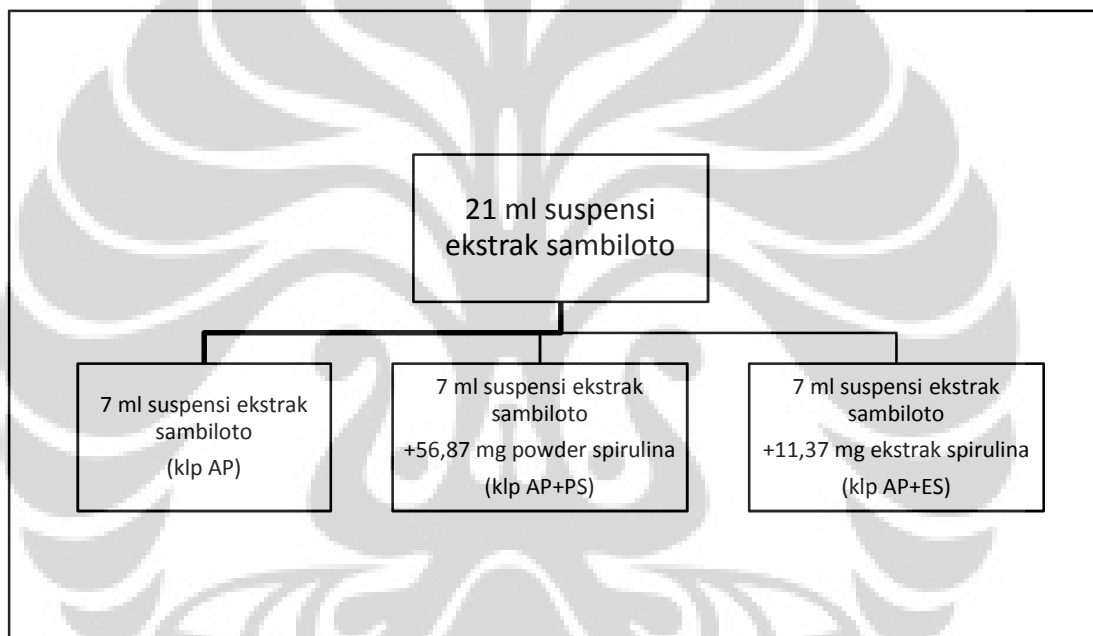
(lanjutan)

Perhitungan dosis ekstrak etanol spirulina (*Arthrospira platensis*)

Dengan memperhitungkan rendemen ekstrak yaitu 20% maka jumlah ekstrak etanol spirulina yang digunakan yaitu $20\% \times 56,87 \text{ mg} = 11,37 \text{ mg}$.

Maka untuk 17 ekor mencit, ditimbang sebanyak 11,37 mg ekstrak spirulina dan dicampurkan ke dalam 7 ml suspensi sabiloto.

Dosis tersebut di atas diberikan 0,4 ml/25 g bb, apabila berat mencit lebih atau kurang dari 25 gram, maka volume suspensi yang diberikan disesuaikan.



Skema pembuatan suspensi ekstrak bahan uji

Lampiran 17. Alur kerja

