

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1. Latar belakang

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium spp* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk betina *Anopheles spp*<sup>1</sup>. Ada lima spesies *Plasmodium* yang menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium knowlesi*. Di antara kelima, *P. falciparum* merupakan penyebab terbanyak kasus malaria dan merupakan penyebab malaria berat<sup>2</sup>. Sedangkan di Papua dan Papua Nugini, di mana transmisi malaria sangat intens, *P. vivax* menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas malaria, terutama pada bayi dan anak-anak yang masih muda<sup>3</sup>.

Berdasarkan laporan terbaru dari WHO, pada tahun 2023 diperkirakan terdapat 263 juta kasus malaria dengan 597.000 kematian di seluruh dunia<sup>3</sup>. Angka tersebut meningkat dari 252 juta pada tahun 2022, meskipun beberapa usaha pemberantasan malaria telah dicanangkan oleh WHO, antara lain pemberian *artemisinin-based combination therapy* (ACT) sebagai terapi lini pertama, distribusi kelambu yang telah diberi insektisida, penyemprotan dengan insektisida, dan penerapan penggunaan *rapid diagnostic test* (RDT) sebelum pemberian terapi untuk mencegah terjadi resistensi parasit<sup>3,4</sup>.

Indonesia merupakan negara endemis malaria dengan laporan jumlah kasus pada tahun 2022 sebanyak 443.530, sebanyak 89% kasus positif malaria dilaporkan dari Provinsi Papua<sup>5</sup> kemudian turun menjadi 418.546 kasus pada tahun 2023 dengan angka kematian 121 kasus<sup>6</sup>. Pertemuan Strategi Teknis Global untuk Malaria (GTS) 2020 di Kawasan Asia Tenggara WHO melaporkan Indonesia merupakan satu-satunya negara di kawasan ini yang gagal mengurangi kasus malaria dan angka kematian yang disebabkan oleh penyakit ini dari target 40%<sup>4</sup>, menunjukkan bahwa masih ada tantangan yang harus diatasi dalam upaya pengendalian malaria di negara ini.



Tanpa pengobatan secara langsung, kasus ringan malaria dapat segera t yang menyebabkan kematian. Salah satu kendala dalam malaria adalah kemampuan parasit *Plasmodium* dalam kanisme resistensi terhadap obat antimalaria. Hingga kini obat ama telah beberapa kali mengalami pergantian, mulai dari pirimetamin, kemudian artemisinin<sup>7</sup>. Resiko terjadinya resistensi

dapat diminimalisir dengan penggunaan obat kombinasi menggunakan turunan artemisinin, misalnya artesunate-amodiaquin dan kombinasi lainnya. Namun, terdapat kekhawatiran karena strain parasit yang resisten terhadap turunan artemisinin yang pertama kali dilaporkan tahun 2012 di perbatasan Thailand-Kambodja<sup>8</sup>, telah menyebar ke Afrika<sup>9</sup> dan kini bahkan ke Papua Nugini<sup>10</sup> yang berbatasan dengan salah satu provinsi di Indonesia yang masih endemik malaria. Oleh karena itu, diperlukan penelitian alternatif obat-obat yang memiliki efek anti-malaria. Salah satu bahan alam yang telah digunakan masyarakat untuk pengobatan malaria adalah daun kelor.

Daun kelor dapat dengan mudah ditemukan di berbagai daerah di Indonesia, termasuk di Makassar. Daun kelor telah terbukti memiliki efek antimalaria yang diekstraksi dari berbagai pelarut<sup>11</sup>. Efek tersebut berkaitan dengan kandungan senyawa fenolik terutama flavonoid yang banyak dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria.<sup>11</sup> Beberapa penelitian telah membandingkan beberapa pelarut namun tidak memabandingkan semua dalam satu penelitian, hasilnya masih tidak konsisten antara satu dengan yang lain, dan kontrol positif masih menggunakan klorokuin yang merupakan obat lama dan tidak lagi digunakan dalam pengobatan malaria.<sup>12-14</sup> Berbagai pelarut memiliki sifat yang berbeda dan dapat mengekstrak senyawa yang berbeda bergantung sifat kepolaran senyawa yang diekstrak. Penelitian sebelumnya telah menguji efek antimalaria ekstrak metanol daun kelor namun hasil menunjukkan efek supresi yang masih cukup rendah dibanding artesunate (17% VS 86%)<sup>15</sup>. Penelitian ini membandingkan efek supresi parasit dari berbagai pelarut dengan kepolaran yang berbeda (air, metanol, etanol, n-heksan), kemudian dilakukan fraksinasi. Dengan diperolehnya informasi mengenai pelarut yang memberi hasil supresi parasit terbaik, dapat dianalisis kemungkinan metabolit aktif yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria.

## 1.2. Tinjauan Pustaka

### 1.2.1. Daun kelor sebagai tanaman obat

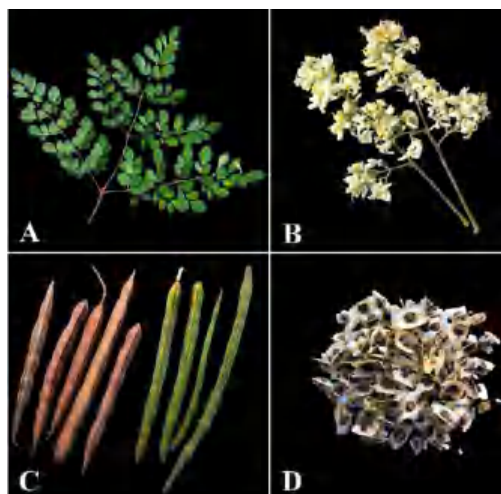


Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

atau lebih dikenal sebagai kelor, merupakan tanaman yang termasuk dalam keluarga Moringaceae. Tanaman ini berasal dari daerah tropis dan subtropis di Asia Selatan, terutama di India, tetapi telah tersebar luas di berbagai negara, termasuk di Indonesia. Kelor memiliki ciri khas berupa daun kecil berbentuk oval,

bunga putih kekuningan, serta buah berbentuk polong panjang. Daun kelor kaya akan protein, vitamin A, C, kalsium, serta berbagai fitokimia aktif seperti flavonoid, saponin, dan tanin yang memberikan manfaat kesehatan yang luas.<sup>16–</sup>

19



Gambar 1. Organ dari tumbuhan kelor, A. daun, B. bunga, C. buah, D. biji

Daun kelor telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional di berbagai negara, termasuk India, Afrika, dan Asia Tenggara. *Moringa oleifera* telah dikenal dalam sistem pengobatan tradisional seperti Ayurveda dan Unani karena perannya sebagai pencegahan dan terapi.<sup>20</sup> Studi farmakologi menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, hepatoprotektif, dan antikanker.<sup>16,20</sup> Di Indonesia, daun kelor telah lama dikenal dalam pengobatan herbal. Tanaman ini digunakan untuk meningkatkan daya tahan tubuh, mengatasi peradangan, serta membantu menurunkan kadar gula darah pada penderita diabetes. Selain itu, penelitian di Indonesia menunjukkan bahwa daun kelor memiliki potensi sebagai agen antibakteri dan antijamur yang efektif dalam mengatasi berbagai infeksi kulit.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

#### antimalaria senyawa bioaktif ekstrak *Moringa oleifera*

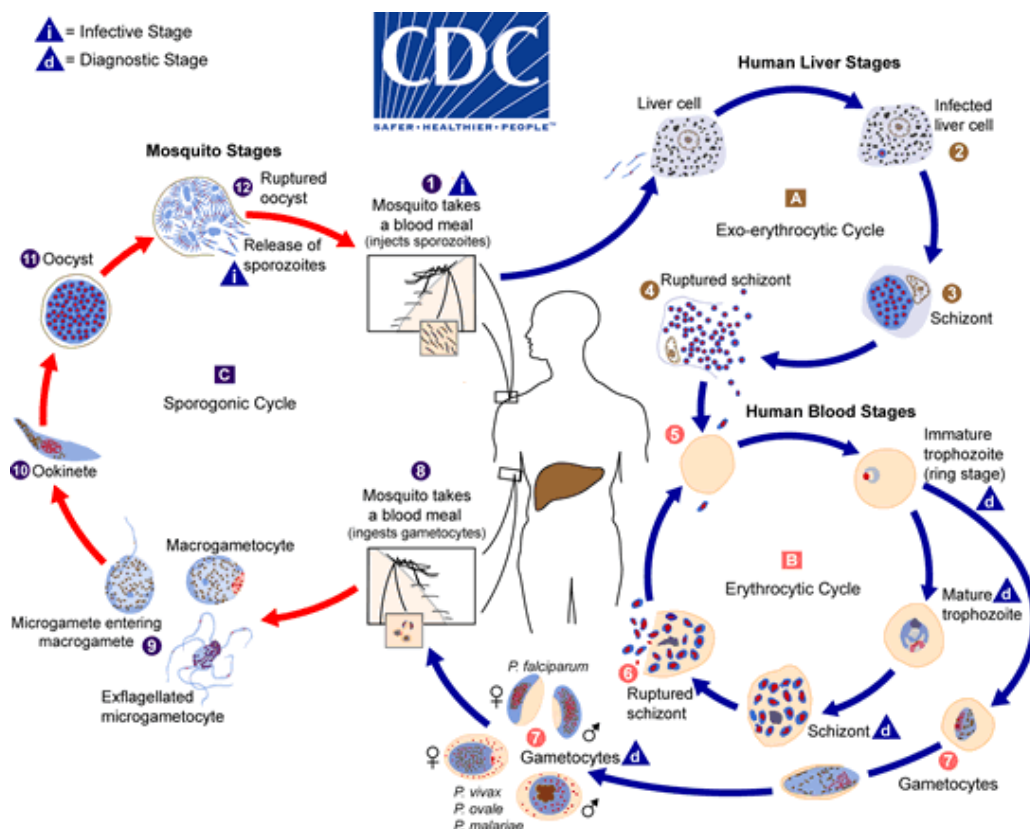
senyawa bioaktif dalam ekstrak *Moringa oleifera* terhadap  
tikan berbagai jalur biokimia yang menghambat pertumbuhan  
ioaktif dalam daun kelor dapat mengganggu transport nutrisi

yang esensial bagi pertumbuhan *Plasmodium* di dalam eritrosit,<sup>21</sup> sehingga menyebabkan kelaparan sel parasit dan memperlambat perkembangannya. Beberapa flavonoid dalam daun kelor berperan dalam menghambat kemampuan *Plasmodium* untuk menyerang dan menginfeksi sel darah merah,<sup>22</sup> sehingga siklus hidup parasit terganggu. Beberapa senyawa mengganggu enzim-enzim yang berperan dalam sintesis DNA *Plasmodium*,<sup>23</sup> sehingga menghambat replikasi dan perkembangan parasit di dalam tubuh inang. Komponen bioaktif daun kelor juga diketahui dapat menghambat jalur metabolisme energi *Plasmodium*, terutama melalui inhibisi enzim mitokondria yang berperan dalam produksi ATP, menyebabkan parasit kehilangan sumber energinya dan akhirnya mati.<sup>24</sup>

### 1.2.3. Penggunaan *Plasmodium berghei* dan Hewan Uji Mencit dalam Studi Antimalaria

*Plasmodium* menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi malaria dalam bentuk sporozoit. Saat berada di perut nyamuk, mikrogamet menembus makrogamet dan menghasilkan zigot. Zigot kemudian menjadi motil dan memanjang (ookinet) yang menyerang dinding usus tengah nyamuk tempat mereka berkembang menjadi oosit. Oosit tumbuh, pecah, dan melepaskan sporozoit, yang menuju ke kelenjar ludah nyamuk. Saat nyamuk menggigit manusia, terjadi inokulasi sporozoit ke dalam inang manusia. Sporozoit menginfeksi sel hati dan matang menjadi skizon, yang pecah dan melepaskan merozoit. Setelah replikasi awal ini di hati, parasit mengalami multiplikasi aseksual di dalam eritrosit. Merozoit menginfeksi sel darah merah. Trofozoit tahap cincin matang menjadi skizon, yang pecah melepaskan merozoit. Beberapa parasit berdiferensiasi menjadi tahap eritrositik seksual (gametosit). Parasit tahap darah bertanggung jawab atas manifestasi klinis penyakit ini.<sup>25</sup>





Gambar 2. Siklus hidup Plasmodium

Lima spesies utama yang menginfeksi manusia adalah *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium knowlesi*. Namun, spesies yang sering digunakan dalam penelitian in vivo pada hewan pengerat adalah *Plasmodium berghei*. Spesies ini umum digunakan dalam penelitian antimalaria karena patogenesitasnya yang menyerupai malaria pada manusia dan kemudahan manipulasi pada hewan uji mencit. Model ini memungkinkan evaluasi efikasi kandidat obat dalam lingkungan in vivo, serta memberikan data terkait mekanisme aksi obat dan efek imunomodulator.<sup>26</sup> *Plasmodium berghei* diketahui menyebabkan infeksi akut pada mencit. Infeksi *P. berghei* menyebabkan anemia parah bahkan pada tingkat parasitemia rendah, yang menunjukkan relevansi mencit sebagai model akut untuk memahami sistem hematologi.<sup>27</sup>



*Plasmodium berghei* dilakukan secara intraperitoneal (IP). Metode ini menunjukkan penyebaran cepat parasit dalam cairan peritoneal, yang merupakan media yang baik untuk infeksi awal ke dalam sirkulasi darah sistemik. Dengan metode ini, parasit dapat mencapai target organ, seperti hati dan limpa, di mana proses infeksi awal

berlangsung sebelum siklus darah dimulai. Selain itu, injeksi IP mudah dilakukan pada mencit atau hewan kecil lainnya, meminimalkan risiko komplikasi dibandingkan metode injeksi lain, seperti intravena, yang membutuhkan keterampilan lebih tinggi untuk mengakses vena kecil. Metode IP juga mengurangi variabilitas dosis yang dapat terjadi pada metode oral karena penyerapan melalui saluran pencernaan bisa tidak merata.<sup>28,29</sup>

Metode yang biasa digunakan pada penelitian in vivo antimalaria adalah *Peter's 4-day suppressive test*. Metode ini dikenal sebagai pendekatan andal dalam mengevaluasi potensi antiplasmodial suatu senyawa. Dalam protokol ini, pengobatan dimulai segera setelah infeksi untuk mengevaluasi tingkat supresi parasit, memberikan informasi penting tentang aktivitas awal senyawa antimalaria.<sup>30</sup>

Obat standar lini pertama digunakan sebagai kontrol positif. Artesunate adalah salah satu senyawa derivatif artemisinin yang sangat efektif dan digunakan secara luas dalam terapi kombinasi antimalaria. Penggunaan kontrol positif ini memastikan standar perbandingan efikasi karena aktivitas antimalarianya yang terbukti terhadap *Plasmodium berghei* dalam uji hewan.<sup>31</sup>

#### 1.2.4. Penggunaan Pelarut dengan Polaritas Berbeda dalam Ekstraksi *Moringa oleifera*

Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan saat memilih pelarut atau sistem pelarut untuk mengekstraksi bahan tanaman meliputi polaritas/kelarutan dari konstituen target, keamanan, kemudahan bekerja dengan pelarut, potensi pembentukan artefak, serta mutu dan kemurnian pelarut. Pelarut atau campuran pelarut harus dipilih berdasarkan pertimbangan zat yang akan diekstraksi. Pelarut yang digunakan harus sesuai dengan kelas senyawa yang diteliti. Misalnya, senyawa polar seperti fenol atau flavonoid lebih mudah diekstraksi dengan pelarut polar seperti air atau metanol, sedangkan senyawa nonpolar seperti terpenoid atau lipid lebih efektif diekstraksi menggunakan pelarut nonpolar seperti n-heksana. Jika informasi rinci tentang senyawa target tidak tersedia, pendekatan praktis adalah menggunakan pelarut yang diasumsikan memiliki polaritas



arget berdasarkan pengalaman atau literatur yang ada. Contohnya, akan sebagai pelarut polar untuk senyawa yang memiliki gugus antara kloroform atau n-heksana digunakan untuk senyawa dengan kelas macam pelarut dari polaritas terendah hingga tertinggi dapat

Tabel 1. Berbagai pelarut dan tingkat polaritasnya

| No  | Pelarut           | Polaritas |
|-----|-------------------|-----------|
| 1.  | <i>n</i> -Heksan  | 0.009     |
| 2.  | Petroleum eter    | 0.117     |
| 3.  | Dietil eter       | 0.117     |
| 4.  | Etil asetat       | 0.228     |
| 5.  | Kloroform         | 0.259     |
| 6.  | Diklorometana     | 0.309     |
| 7.  | Aseton            | 0.355     |
| 8.  | <i>n</i> -Butanol | 0.586     |
| 9.  | Etanol            | 0.654     |
| 10. | Metanol           | 0.762     |
| 11. | Air               | 1.000     |

Polaritas pelarut memengaruhi efisiensi ekstraksi senyawa bioaktif dari tanaman. Dalam penelitian antimalaria, penggunaan pelarut seperti metanol, etanol, dan *n*-heksana bertujuan untuk mengeksplorasi spektrum senyawa aktif dari berbagai kelompok kimia, yang masing-masing mungkin memiliki aktivitas antiplasmodial unik.<sup>33</sup>

#### 1.2.5. Fraksinasi Meningkatkan Efikasi Senyawa Alami Antimalaria

Fraksinasi adalah teknik pemisahan senyawa dalam ekstrak tumbuhan atau bahan alami berdasarkan sifat fisika dan kimia, seperti polaritas. Selama proses fraksinasi, pelarut ditambahkan secara berurutan berdasarkan peningkatan polaritas, dimulai dari pelarut nonpolar seperti *n*-heksana hingga pelarut polar seperti air. Pendekatan ini dirancang untuk memisahkan kelompok senyawa yang memiliki sifat polaritas berbeda, sehingga memungkinkan isolasi senyawa bioaktif tertentu.<sup>34</sup>

Proses fraksinasi membantu memusatkan senyawa aktif dan mengeliminasi komponen tidak aktif atau toksik, yang pada akhirnya dapat meningkatkan efikasi dan keamanan agen antimalaria. Contohnya adalah ekstrak *Senna occidentalis* yang telah menunjukkan aktivitas antiplasmodial lebih tinggi setelah melalui fraksinasi polar.<sup>35</sup>



adalah

langkah tersebut di atas, maka perumusan masalah penelitian

yang digunakan dalam ekstraksi daun kelor yang memberikan efek

an parasit Plasmodium terbaik pada mencit yang terinfeksi?

- b. Senyawa aktif apa yang mungkin terdapat dalam daun kelor yang memberikan efek antimalaria?

#### 1.4. Tujuan penelitian

##### 1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui efektivitas supresi parasit malaria dari ekstrak metanol, etanol, dan n-heksan daun kelor pada hewan coba mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*, serta mengidentifikasi senyawa aktif yang berpotensi sebagai agen antimalaria untuk dikembangkan lebih lanjut dengan teknologi nanopartikel.

##### 1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Melakukan ekstraksi daun kelor dengan berbagai pelarut
- b. Menentukan ekstrak (metanol, etanol, atau n-heksan) yang memiliki efek supresi parasit malaria yang paling signifikan pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*
- c. Mengevaluasi efek antimalaria dari senyawa aktif yang teridentifikasi pada hewan coba mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*
- d. Mengidentifikasi senyawa aktif dalam ekstrak daun kelor yang memiliki potensi antimalaria menggunakan metode tinjauan pustaka

#### 1.5. Manfaat Penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian yang hendak dicapai, maka penelitian ini diharapkan memberikan manfaat sebagai berikut:

##### 1.4.1. Manfaat Teoritis

##### 1. Pengembangan Pengetahuan Ilmiah

Penelitian ini akan menambah pengetahuan tentang efikasi berbagai pelarut ekstraksi (metanol, etanol, dan n-heksan) dalam mengekstraksi senyawa bioaktif dari daun kelor yang berpotensi sebagai agen antimalaria.



Penelitian Lanjutan

Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut yang mungkin dapat melakukan isolasi senyawa spesifik yang bertanggung jawab atas efek antimalaria dan mekanisme aksi senyawa tersebut terhadap *Plasmodium berghei*.

### 3. Kontribusi Terhadap Farmakologi dan Fitokimia

Studi ini dapat memperkaya literatur dalam bidang farmakologi dan fitokimia mengenai potensi daun kelor sebagai sumber bahan obat alami untuk malaria, serta peran pelarut dalam ekstraksi senyawa aktif.

#### 1.4.2. Manfaat Praktis

##### a. Bagi Penulis

###### 1. Peningkatan kompetensi riset

Penulis akan memperoleh pengalaman dan keterampilan dalam melakukan penelitian eksperimental, termasuk perancangan, pelaksanaan, dan analisis data penelitian.

###### 2. Pemahaman lebih mendalam tentang proses ekstraksi

Penulis akan mendapatkan pemahaman mendalam tentang proses ekstraksi dan perbedaan efikasi ekstrak yang diperoleh dari berbagai pelarut, serta aplikasinya dalam bidang kesehatan.

###### 3. Peningkatan kredibilitas akademik

Keberhasilan dalam penelitian ini akan meningkatkan kredibilitas akademik penulis dan dapat membuka peluang untuk kolaborasi penelitian lebih lanjut atau pendanaan penelitian.

##### b. Bagi instansi tempat penelitian

###### 1. Kontribusi pada pengembangan ilmu pengetahuan

Hasil penelitian ini akan menambah koleksi pengetahuan ilmiah yang dimiliki oleh instansi, yang dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya.

###### 2. Peningkatan reputasi

Meningkatkan reputasi instansi sebagai lembaga yang aktif dalam riset dan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang kesehatan dan



n produk berbasis riset

untuk mengembangkan produk antimalaria berbasis ekstrak daun

kelor, yang dapat dipatenkan dan dikomersialkan, memberikan manfaat ekonomi dan sosial.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

### 1.6. Orisinalitas Penelitian

Penelitian-penelitian yang sudah melaporkan aktivitas antimalaria daun kelor dengan berbagai pelarut sebagai berikut;

Tabel 2. Orisinalitas penelitian

| Peneliti<br>(Tahun)               | Judul                                                                                                                                                            | Variabel                                                                                                                                                                                         | Hasil                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Daskum<br>AM et al<br>(2019)      | Antiplasmodial activities of crude <i>Moringa oleifera</i> leaves extracts on chloroquine sensitive <i>Plasmodium falciparum</i> (3D7).                          | Efisiensi antimalaria dari ekstrak <i>M. oleifera</i> kasar dengan pelarut heksan, metanol, dan lyophilized aqueous pada strain sensitif chloroquine (CQS) <i>Plasmodium falciparum</i> (3D) (7) | Pada konsentrasi terendah dari ekstrak (6,25 µg/ml), tingkat supresi plasmodium ekstrak daun kelor dengan pelarut heksan, metanol, lyophilized aqueous berturut-turut 63,52%, 71,42% dan 60,65%. Pada konsentrasi ekstrak tinggi tingkat supresi sebesar 71,31%, 83,06%, dan 80,36% untuk pelarut heksan, metanol dan ekstrak aqueous lyophilized. <sup>12</sup>                                 |
| Olaniran<br>O et al<br>(2019)     | Antiplasmodial, antipyretic, haematological and histological effects of the leaf extracts of <i>Moringa oleifera</i> in <i>Plasmodium berghei</i> infected mice. | Aktifitas antimalaria dan antipiretik ekstrak air dan etanolik dari daun <i>Moringa oleifera</i>                                                                                                 | Dosis tertinggi (400mg/kg dan 800mg/kg) dari kedua ekstrak memberikan aktivitas antiplasmodial secara signifikan lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) daripada obat standar. Pelarut air memiliki efek supresi parasit yang lebih baik dari pelarut etanolik. <sup>14</sup>                                                                                                                               |
| Ogundapo<br>SS et al<br>(2015)    | Evaluation of <i>Moringa oleifera</i> as antiplasmodial agents in the control of malaria.                                                                        | Aktifitas antiplasmodial ekstrak kasar daun kelor dengan pelarut metanol dan fraksi                                                                                                              | Frasaksi dosis rendah F2 (fraksi ke 2 C100:M0) dan F5 (C60:M40) memiliki aktivitas yang lebih tinggi daripada dosis tinggi ekstrak kasar secara statistik signifikan ( $p < 0,05$ ) di F5 tetapi tidak pada F2 ( $p > 0,05$ ). Persentase rata-rata penekanan parasit pada kelompok kontrol positif lebih tinggi daripada fraksi F5 tetapi tidak secara signifikan ( $p > 0,05$ ). <sup>36</sup> |
| Olasehin<br>de GI et al<br>(2016) | In vivo antiplasmodial activity of crude ethanolic and N-hexane extracts of <i>Moringa leaves</i> .                                                              | Aktifitas antiplasmodial ekstrak daun kelor dengan pelarut etanol dan n-hexan                                                                                                                    | Ekstrak daun <i>M. oleifera</i> menunjukkan penghambatan signifikan parasitaemia ( $p \leq 0.05$ ), mulai dari 74,7 hingga 95,6% untuk ekstrak etanolik dan 59,3 hingga 87,9% untuk ekstrak n-heksan. <sup>13</sup>                                                                                                                                                                              |

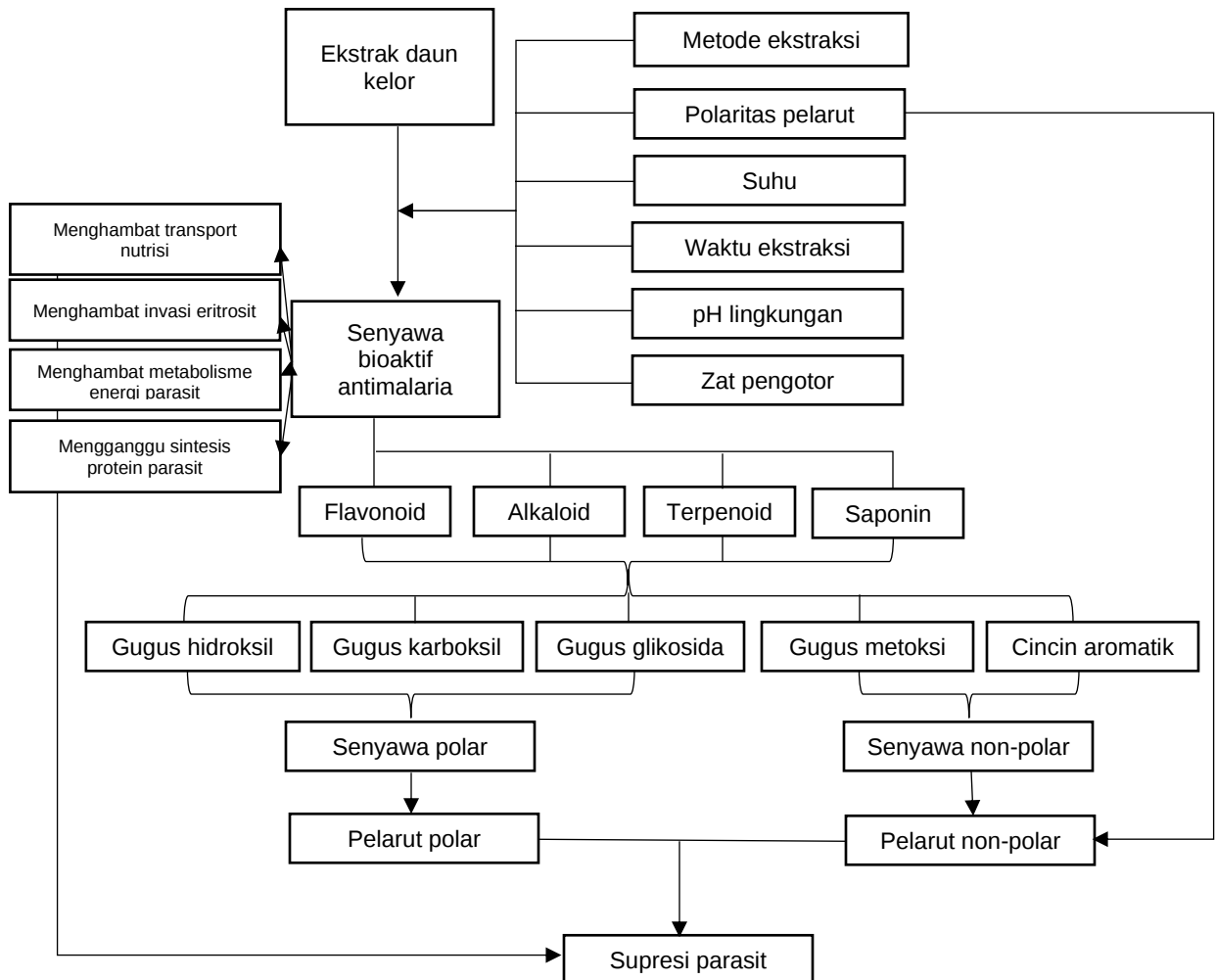


ndingkan empat macam pelarut dengan polaritas yang berbeda anol, etanol, dan n-heksan, serta melakukan fraksinasi pada memiliki tingkat supresi parasit tertinggi.

### cup Penelitian

penelitian di bidang farmakologi, farmasi, dan parasitologi.

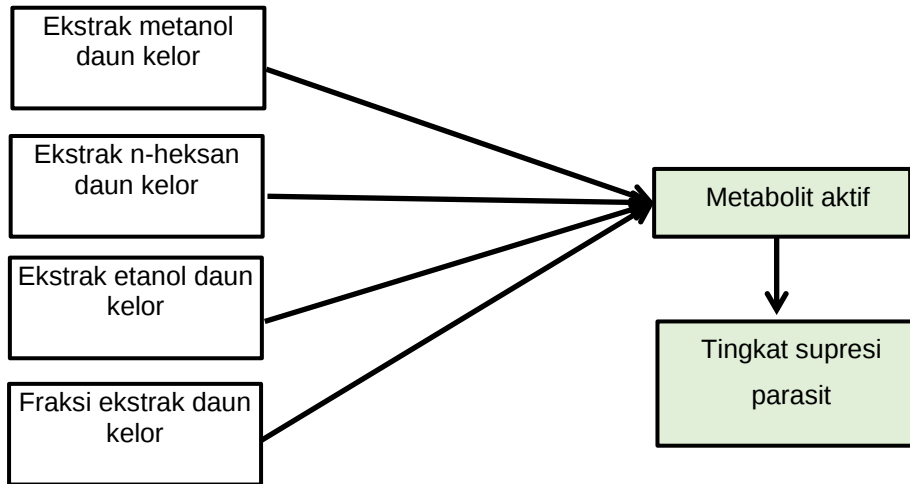
### 1.8. Kerangka Teori



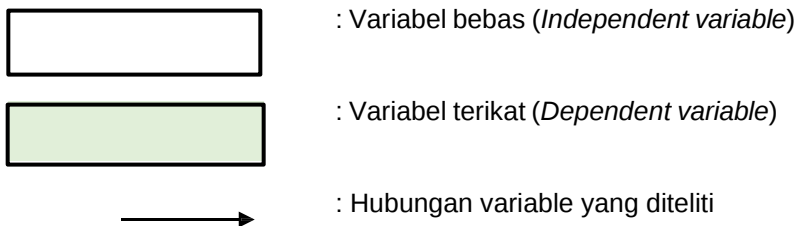
Gambar 3. Kerangka teori



### 1.9. Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka konsep penelitian



### 1.10. Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan *literature review* diatas, maka hipotesis dari penelitian ini adalah Penggunaan pelarut yang berbeda dalam proses ekstraksi memberikan tingkat supresi parasit yang berbeda dan fraksi ekstrak daun kelor memberikan aktivitas antimalaria yang lebih baik dari ekstrak kasarnya.



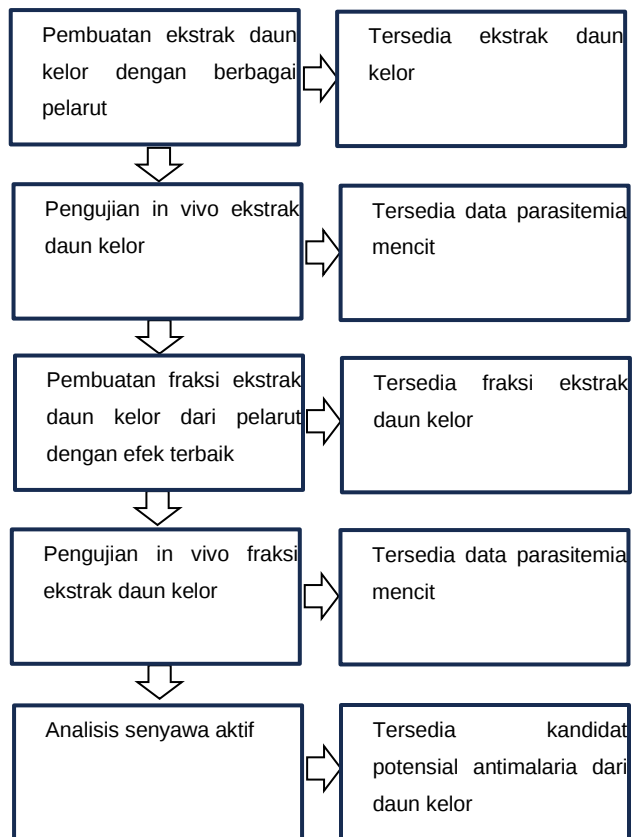
### 1.11. Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi operasional

| Variabel Penelitian              | Definisi Operasional                                                                                                                        | Kriteria Objektif                                                                                         | Skala   |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Variabel Independen</b>       |                                                                                                                                             |                                                                                                           |         |
| <b>Jenis ekstrak</b>             | Ekstrak daun kelor yang didapatkan dengan metode maserasi dengan pelarut methanol, etanol, n-heksan, dan air                                | Air, metanol, etanol, n-heksan                                                                            | Nominal |
| <b>Fraksi ekstrak daun kelor</b> | Fraksi dari ekstrak kasar daun kelor                                                                                                        | Fraksi larut heksan, fraksi tidak larut heksan, fraksi larut etil asetat, fraksi tidak larut etil asetat, | Nominal |
| <b>Variabel Dependen</b>         |                                                                                                                                             |                                                                                                           |         |
| <b>Parasitemia</b>               | Persentase sel darah merah yang terinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> pada mencit donor                                                      | %                                                                                                         | Rasio   |
| <b>Supresi parasit</b>           | Penurunan persentase parasitemia pada mencit yang diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> setelah perlakuan dibandingkan dengan kontrol negatif | %                                                                                                         | Rasio   |



### 1.12. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian



## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental pra-klinik dengan uji in vivo untuk mengevaluasi efek ekstrak daun kelor dengan berbagai pelarut terhadap supresi parasit malaria pada mencit. Desain ini memungkinkan untuk menilai efektivitas dan potensi antimalaria dari ekstrak yang diuji.

### 2.2. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di beberapa lokasi. Pengambilan sampel dilakukan di desa Lewreng, kecamatan Donri-donri, kabupaten Soppeng. Pembuatan ekstrak dilakukan di laboratorium fitokimia Fakultas Farmasi Unhas dan pengujian hewan coba dilakukan di animal lab Fakultas Kedokteran Unhas.

### 2.3. Alat dan Bahan

Tabel 4. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian

| Alat dan bahan untuk ekstraksi daun kelor | Alat dan bahan untuk uji in vivo           |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1. daun kelor                             | 1. mikroskop                               |
| 2. etanol 96% teknis                      | 2. minyak emersi                           |
| 3. etanol absolut pro analisis            | 3. mencit                                  |
| 4. metanol pro analisis                   | 4. pemeliharaan mencit: sekam, pakan, air  |
| 5. heksan pro analisis                    | 5. kotak slide glass                       |
| 6. aquades                                | 6. object glass                            |
| 7. etil asetat                            | 7. cryotube                                |
| 8. oven                                   | 8. spuit injection 1 cc                    |
| 9. wadah maserator                        | 9. hansscoen                               |
| 10. cawan porselen                        | 10. alkohol 70%                            |
| 11. corong pisah                          | 11. heparin                                |
| 12. ...                                   | 12. frozen stock <i>Plasmodium berghei</i> |
| 13. ...                                   | 13. ketamin                                |
| 14. ...                                   | 14. artesunat                              |



for

|                  |                      |
|------------------|----------------------|
| 16. Na CMC       | 15. falcon tube      |
| 17. Panci infusa | 16. tabung Eppendorf |
| 18. DMSO         | 17. NaCl 0,9%        |
|                  | 18. Giemsa 5%        |
|                  | 19. Sonde            |

## 2.4. Hewan uji

### 2.4.1 Besar sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus Federer sebagai berikut:

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

keterangan:

t: jumlah kelompok perlakuan (6 kelompok)

n: jumlah sampel tiap kelompok

perhitungan:

Perhitungan :

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

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Besar sampel tiap kelompok adalah 4 ekor

### 2.4.2 Kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria inklusi:

1. Mencit galur Balb/c
2. Hewan dalam keadaan sehat
3. Berat 20-40 gram
4. Usia 6-8 minggu



gresif, tidak lincah atau lemah sebelum perlakuan

akit yang ditandai dengan keluar sekret dari mata, dan hidung  
an

### 2.4.3 Aklimatisasi hewan coba

Aklimatisasi dilakukan agar mencit mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung. Pemeliharaan mencit uji di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Mencit uji diaklimatisasi pada suhu ruangan dilakukan selama 7 hari sebelum pengujian. Mencit uji ditempatkan di dalam ruangan bersih dengan siklus cahaya 12 jam terang dan 12 jam gelap. Mencit diberi pakan standar dan minum.

Kandang pemeliharaan terbuat dari plastik berukuran 30 cm x 16 cm x 16 cm yang dilengkapi kawat penutup. Kandang uji diberi sekam sebagai penghangat bagi mencit. Kandang mencit juga dilengkapi dengan botol minum di bagian atasnya. Dilakukan pemantauan suhu dan kelembaban setiap hari dengan kisaran optimal yaitu  $26,56 \pm 1,46^{\circ}\text{C}$  dan  $82,86 \pm 7,08\%$ . Sekam dalam kandang dan botol minuman dibersihkan dan diganti setiap dua hari sekali, sedangkan air minum diisi ulang apabila air telah habis.



Gambar 6. Aklimatisasi hewan coba

## 2.5. Prosedur penelitian

### 2.5.1. Prosedur ekstraksi dan infundasi daun kelor

Ekstraksi daun kelor dilakukan dengan teknik maserasi. Sebanyak 1.076 gr daun an dengan oven suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Simplisia kering ara diblender hingga menjadi serbuk. Simplisia serbuk tersebut agian untuk diekstraksi menggunakan pelarut metanol, etanol, satu bagian simplisia ditambahkan dengan 10 bagian masing-kemudian direndam dan didiamkan selama 24 jam sambil



sesekali diaduk. Setelah itu, campuran disaring untuk memisahkan ampas dan maseratnya. Proses penyarian diulangi menggunakan jenis pelarut yang sama dengan jumlah volume pelarut yang setara dengan volume pelarut pada penyarian pertama. Proses penyarian ketiga diulangi dengan jumlah volume pelarut setengah kali dari volume pelarut pada penyarian kedua. Semua maserat yang diperoleh dikumpulkan, lalu diuapkan menggunakan rotavapor hingga didapatkan ekstrak kental. Rendemen yang dihasilkan dihitung sebagai persentase bobot (b/b) antara rendemen dan bobot serbuk simplisia yang digunakan. Ekstrak dibuat sediaan oral berupa suspensi<sup>37</sup>.



Gambar 7. Maserasi, penyaringan, evaporasi, dan penguapan sisa pelarut

Infundasi dilakukan untuk pelarut air. Infusa 10% dibuat setiap hari pada hari yang sama dengan hari perlakuan karena masa simpannya yang pendek. 1,5 g serbuk simplisia dibasahi dengan 3 mL akuades, kemudian dicampur dengan 15 mL akuades, kemudian dipanaskan dalam panci infusa pada suhu 90°C selama 15 menit.

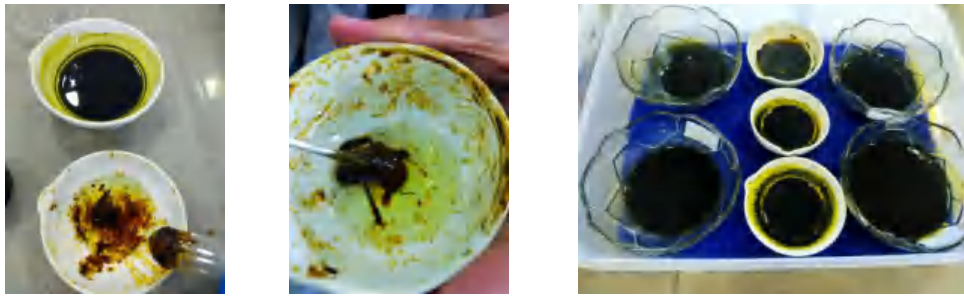
### 2.5.2. Prosedur fraksinasi ekstrak etanol daun kelor

Fraksinasi dilakukan dengan metode triturasi. Ekstrak etanol (6 g) difraksinasi berdasarkan menggunakan n-heksana dan etil asetat. Ekstrak etanol secara bertahap ditambahkan dengan n-heksana dalam mortar, dan campuran digerus hingga tercampur merata. Filtrat yang dihasilkan, yaitu fraksi yang larut dalam n-heksana, dikumpulkan, dan proses diulang hingga n-heksana menjadi bening.



kan dua fraksi yaitu fraksi larut n-heksan dan fraksi tidak larut ng tersisa dari fraksi yang tidak larut dalam n-heksana (3 gr) an cara yang sama dengan etil asetat untuk menghasilkan tidak larut dalam etil asetat. Fraksi yang diperoleh dikeringkan menghitung hasil fraksi dan disimpan pada suhu 4°C hingga

pengujian in vivo.



Gambar 8. Fraksinasi ekstrak etanol daun kelor dengan metode trituras

### 2.5.3. Prosedur pembuatan mencit donor

Langkah pertama dalam uji antiplasmodium secara in vivo adalah pembuatan mencit donor. Pada tahap ini digunakan mencit sebanyak 2 ekor. Darah yang mengandung *Plasmodium berghei* sebanyak 200  $\mu$ l disiapkan dari frozen stock. Darah yang mengandung *Plasmodium berghei* kemudian diinjeksi secara intraperitoneal (i.p) sebanyak 100  $\mu$ l ke masing-masing mencit. Parasitemia mencit donor diamati setiap hari dengan membuat apusan darah dari ekor mencit hingga mencapai angka parasitemia lebih dari 10%.



Gambar 9. Pembuatan mencit donor dan *cardiac puncture*

### 2.5.4. Prosedur pengujian in vivo ekstrak daun kelor berbagai pelarut

Setelah didapatkan mencit donor adalah melakukan *Peter's 4-day suppressive test*<sup>15</sup>. Darah mencit donor dengan konsentrasi parasit 15% diambil dari *cardiac puncture*, didapatkan darah sebanyak 800  $\mu$ l dicampurkan dengan 60  $\mu$ l heparin. Darah diencerkan dengan 2.825  $\mu$ l normal salin hingga didapatkan darah dengan konsentrasi parasit  $10^7$  parasit/100  $\mu$ l. Sisa darah disimpan sebagai *frozen stock*.



ng mencit perlakuan diinduksi secara intraperitoneal (ip) (100  $\mu$ l). Setelah induksi, mencit dikelompokkan menjadi 6

kelompok, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, serta 4 kelompok perlakuan. Tiga jam setelah induksi, masing-masing kelompok diberi perlakuan yang sesuai (tabel 4).



Gambar 10. Uji in vivo ekstrak daun kelor

Kelompok 1 diberi 0,2 ml CMC 0,5% per oral, kelompok 2 diberi artesunat 6mg/kgBB per oral, kelompok 3 diberi ekstrak metanol daun kelor dengan dosis 300 mg/kgBB per oral, kelompok 4 diberi ekstrak etanol daun kelor dengan dosis 300 mg/kgBB per oral, kelompok 5 diberi ekstrak n-heksan daun kelor dengan dosis 300 mg/kgBB per oral, dan 6 diberi infusa 10% dengan dosis 300 mg/kgBB. Perlakuan diberikan sekali sehari selama empat hari. Persen parasitemia dan supresi parasit diperiksa pada hari kelima. Ekstrak daun kelor dengan tingkat supresi parasit terbaik selanjutnya difraksinasi menggunakan etil asetat, dan n-heksan. Hasil fraksinasi kemudian diujikan kembali pada mencit menggunakan prosedur *Peter's 4-day suppressive test*.

Tabel 5. Kelompok uji antimalaria ekstrak daun kelor berbagai pelarut

| Kelompok        | Perlakuan                   | Dosis       |
|-----------------|-----------------------------|-------------|
| Kontrol negatif | CMC 0,5%                    | 0,2 mL      |
| Kontrol positif | Artesunat                   | 6 mg/kgBB   |
| Perlakuan       | Ekstrak metanol daun kelor  | 300 mg/kgBB |
|                 | Ekstrak etanol daun kelor   | 300 mg/kgBB |
|                 | Ekstrak n-heksan daun kelor | 300 mg/kgBB |
|                 | Infusa 10%                  | 300 mg/kgBB |

#### 2.5.5. Prosedur pengujian in vivo fraksi ekstrak etanol daun kelor



dengan konsentrasi parasit 13% diambil dari *cardiac puncture* sebanyak 850  $\mu$ l dicampurkan dengan 60  $\mu$ l heparin. Sebanyak 850  $\mu$ l dicampurkan dengan 2.575  $\mu$ l normal salin hingga didapat 2.695  $\mu$ l dengan konsentrasi parasit  $10^7$  parasit/100  $\mu$ l. Masing-masing mencit diberikan secara intraperitoneal (ip) sebanyak  $10^7$  parasit (100  $\mu$ l).

Setelah induksi, mencit dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, serta 2 kelompok perlakuan. Tiga jam setelah induksi, masing-masing kelompok diberi perlakuan yang sesuai (tabel 5). Kelompok 1 diberi 0,2 ml CMC 0,5% per oral, kelompok 2 diberi artesunat 6mg/kgBB per oral, kelompok 3 diberi fraksi larut heksan daun kelor dengan dosis 300 mg/kgBB per oral, kelompok 4 diberi fraksi tidak larut heksan daun kelor dengan dosis 300 mg/kgBB per oral. Perlakuan diberikan sekali sehari selama empat hari. Persen parasitemia dan supresi parasit diperiksa pada hari kelima. Hasil fraksinasi etil asetat kemudian diujikan kembali pada mencit menggunakan prosedur *Peter's 4-day suppressive test* (kelompok 5 dan 6).

Tabel 6. Kelompok uji antimalaria fraksi ekstrak etanol daun kelor

| Kelompok        | Perlakuan                      | Dosis       |
|-----------------|--------------------------------|-------------|
| Kontrol negatif | CMC 0,5%                       | 0,2 mL      |
| Kontrol positif | Artesunat                      | 6 mg/kgBB   |
| Perlakuan       | Fraksi larut heksan            | 300 mg/kgBB |
|                 | Fraksi tidak larut heksan      | 300 mg/kgBB |
|                 | Fraksi larut etil asetat       | 300 mg/kgBB |
|                 | Fraksi tidak larut etil asetat | 300 mg/kgBB |

\*fraksi dari ekstrak kasar etanol

\*\*fraksi dari HIF

## 2.6. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan perhitungan parasitemia dari darah ekor mencit. Darah dibuat apusan di gelas objek lalu diwarnai dengan Giemsa 5% perendaman selama 30 menit.

Persen parasitemia diukur berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah parasit}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Setelah diketahui persen parasitemia dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif, lalu dihitung supresi parasit menggunakan formula sebagai



$$\text{esi parasit (\%)} = \frac{P_n - P_t}{P_n} \times 100$$

ia kontrol negatif

ia kelompok perlakuan

## 2.7. Analisis Data

Graphpad Prism® digunakan untuk menganalisis penelitian ini. Data dinyatakan sebagai mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Analisis statistik dilakukan menggunakan uji-t tak berpasangan untuk membandingkan dua kelompok. Nilai  $p < 0,05$  dianggap signifikan secara statistik.

## 2.8. Izin Penelitian dan Kelayaan Etik

Penelitian ini telah disetujui oleh komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin (Nomor dokumen: 692/UN4.6.4.5.31/PP36/2024).

## 2.9. Pendanaan

Penelitian ini didanai oleh Dirjen Dikti dengan skema tesis magister dengan nomor kontrak 02035/UN4.22.2/PT.01.03/2024

