

## Uji Antimalaria Ekstrak Buah *Morinda citrifolia* dan Aktivitas Makrofag pada Mencit (*Mus musculus*) setelah Diinfeksi *Plasmodium berghei*

### *Antimalaria assay of fruit extract of Morinda citrifolia and activity of mice (Mus musculus) macrophage after infecting it with Plasmodium berghei*

RAHADI HUTOMO<sup>1</sup>, SUTARNO<sup>1,\*</sup>, WIEN WINARNO<sup>2</sup>, KUSMARDI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

<sup>2</sup> Laboratorium Eksperimental Farmakologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi dan Obat Tradisional, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta 10430.

<sup>3</sup> Laboratorium Imunopatologi, Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia (UI) Jakarta 1002.

\* Korespondensi: Jl. Ir Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. email: ssutarno@mipa.uns.ac.id

Diterima: 17 Mei 2005. Disetujui: 15 Juni 2005.

---

**Abstract.** Malaria is a worldwide disease. Death resulting from the disease was caused by the parasite's resistance to malaria drugs and the immune system problem. The research aimed to know the effect of *M. citrifolia* fruit extract on *Plasmodium berghei* on mice's total red blood cells and the effect of the extract on the number of intraperitoneal macrophage phagocytosing latex after being infected by *P. berghei*. Three doses of fruit extract, 200, 150, 100 mg/kg BB were used in this study. Fansidar was used as a positive control, while distilled water was used as a negative control. The result of this research indicated that a dose of 200 mg/kg BB could reduce the number of parasitemia to 3.576%, dose of 150 mg/kg BB to 4.107%, and dose of 100 mg/kg BB to 13.331% on day 5, and could not reduce any number of parasitemia on the next day. Inhibition by Fansidar reached 0.201%, while distilled water did not show any inhibition activity. Different macrophage activity on phagocytosing latex was taken place. The average of macrophage activity on phagocytosing latex at dose of 200 mg/kg BB was 3.8x10<sup>6</sup> cell, at dose of 150 mg/kg BB was 2.53x10<sup>6</sup> cell/mL, while at dose 100 mg/kg BB was 1.5x10<sup>6</sup> cell/mL, and 2.43x10<sup>6</sup> cell/mL for the control. Based on the study results, it can be concluded that the number of parasitemia reduced at doses 200 and 150 mg/kg BB. However, its activity is much lower than the malaria drug of Fansidar. Macrophage activities increased at a dose of 200 mg/kg BB.

**Keywords:** malaria, *Morinda citrifolia*, parasitemia, *Plasmodium berghei*, macrophage.

---

### PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang sampai saat ini masih menjadi masalah utama kesehatan penduduk dunia. Selama 100 tahun, dunia belum dapat memberikan kontribusi yang jelas terhadap pengobatan penyakit ini (Riley, 2000). European Commision (2002) mengatakan bahwa penyakit tersebut tidak hanya menyerang daerah tropis, tetapi juga menyerang daerah subtropis di seluruh dunia. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Reisberg (1994) yang mengatakan bahwa kematian banyak terjadi pada negara-negara yang menjadi daerah endemik malaria, antara lain Negara-negara Asia Tenggara termasuk Indonesia, India, Meksiko, Haiti, Amerika Tengah, dan negara-negara Afrika.

Data WHO menunjukkan bahwa setiap tahun sekitar 300 juta orang di dunia mempunyai resiko yang sama untuk terjangkit penyakit malaria, dengan tingkat kematian dapat mencapai angka 1 - ,5 juta orang (Yuliandini, 2000), sedangkan Lawrence (2000) menyatakan bahwa sebanyak 3 juta orang yang diketahui meninggal dunia tiap tahunnya selama satu dekade ini disebabkan oleh penyakit malaria.

Sebagai negara endemik menurut Arbani (1991), masalah malaria di Indonesia sering dialami oleh para penduduk yang tinggal di areal persawahan dekat dengan hutan. Selain itu, menurut Departemen Kesehatan RI (1994), peningkatan kasus malaria pertahun yang terjadi di daerah timur akibat adanya pembukaan daerah baru. Pada tahun 1998 dan 1999, menurut Yuliandini (2000), di beberapa daerah, yakni Sumatera, Yogyakarta, Jawa Tengah, Lampung dan Sumatera Utara terjadi peristiwa penyebaran malaria secara besar-besaran. Sebanyak 21 orang meninggal dunia pada peristiwa tersebut, dari 18.812 kasus yang telah dilaporkan. Selain itu dari sumber yang sama, sekitar 10.000 orang terjangkit malaria di Banyumas, Jawa Tengah. Menurut Barcus (2002), antara tahun 1986 dan 1995 angka *annual parasite incidence* (API) di Purworejo berkisar antara 2-11 kasus per 1000 penduduk dalam satu tahun, dari yang biasanya hanya 5 kasus per tahun. Pada tahun 2000, jumlah API pada wilayah tersebut menjadi 44,5%.

Kematian akibat malaria banyak disebabkan oleh lingkungan yang sesuai untuk penyebaran parasit dan sudah resistannya *Plasmodium falciparum* terhadap obat anti-malaria yang sering digunakan,

seperti klorokuin (CQ) (Najera, 1996). Di lain pihak, lemahnya imunitas merupakan salah satu penyebab kematian penderita malaria pada usia anak (Kuby, 1997). Laporan pertama tentang resistansi *P. falciparum* terhadap klorokuin ialah pada awal tahun 1960an di Amerika Selatan dan Asia Tenggara. Menurut D'Alessandro dan Buttiens (2001) kejadian tersebut terulang kembali di Afrika pada akhir tahun 1970. Kemudian kejadian tersebut terus menyebar, menurut Jelinek *et al.*, (2002) banyak penyebaran resistansi tersebut sering disebabkan oleh adanya perpindahan penduduk dari daerah endemik menuju ke daerah yang baru, sedangkan kasus resistansi *P. falciparum* terhadap CQ di Indonesia seperti yang dilaporkan Arbani (1991) sudah menyebar sampai 27 propinsi di Indonesia.

Selain menimbulkan kematian, menurut Noble dan Noble (1983) penyakit ini dapat menyebabkan kerusakan pada organ-organ dalam. Kerusakan tersebut antara lain adalah kerusakan pada otak yang dapat menimbulkan kerusakan pada selaput otak dan terjadi hemoragi pada daerah serebrum. Terjadinya *Black-water fever*, akibat adanya hemolisis intravaskuler yang kemudian diikuti oleh hemoglobinuria. Selain itu masih seringnya peristiwa relapse (kambuh) dan reinfeksi (infeksi ulang) pada penyakit ini.

Kayser *et al.*, (2000) mengatakan banyak senyawa alam dari tumbuhan dapat dijadikan senyawa antimalaria alternatif pengganti obat malaria yang sudah resistan terhadap parasit. Menurut Dzulkarnain (1998) tanaman obat di Indonesia dapat dijadikan sebagai antimalaria, yang bersifat *antiplasmodia* dan juga bersifat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit malaria. Adanya pemberian tanaman obat tersebut terbukti dapat memperpanjang umur mencit yang terserang malaria dengan mencegah kerusakan pada hati dan limpa.

Sudarsono *et al.*, (2002) mengatakan bahwa *Morinda citrifolia* L. biasa digunakan oleh masyarakat Indonesia untuk mengobati malaria. Makinde dan Awe (1997) mengatakan hal yang sama bahwa ekstrak etanol daun *M. lucida* dapat menghambat *P. falciparum* secara *in vitro*, pada penelitian lain Koumaglo *et al.*, (1992) dalam Sudarsono *et al.*, (2002) menyatakan bahwa tiga komponen dari ekstrak kulit batang dan kulit akar, yaitu digitolurein, rubiadin-1-metil, dan damnakantal terbukti menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*. Selain itu pada *P. berghei* juga telah dilakukan penelitian, yaitu oleh Obih *et al.*, (1985) menggunakan *M. lucida* sebagai penghambat pertumbuhan dari *P. berghei*.

Bahan aktif yang sering ditemukan pada buah *M. citrifolia* adalah: L-arginine (Solomon, 1998), xeronine (Wang *et al.*, 2002), senyawa polisakarida (Hirazumi dan Furusawa, 1999), damnakantal (Koumaglo *et al.* 1992) dan antrakuinon. Senyawa-senyawa ini antara lain berfungsi sebagai antiviral, sitotoksik, dan antimikrobia (Ali *et al.*, 2000). Selain itu buah *M. citrifolia* juga mengandung senyawa morindon, soranjidiol, scopoletin, dan terpen.

Penelitian yang dilakukan oleh Hirazumi dan Furusawa (2000) menyatakan bahwa *M. citrifolia* juga dapat menekan pertumbuhan tumor dengan meningkatkan aktivitas sistem imun inang dan mengurangi aktivitas agen immunosupresif. Mekanisme penghambatan tersebut diindikasikan oleh terstimulasikannya faktor sistem imun, antara lain *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-10, interleukin-12 p70, dan interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Selain itu *M. citrifolia* diduga dapat menginduksi aktivasi dari makrofag.

Semakin banyaknya kasus resistansi malaria terhadap CQ, dan belum adanya penelitian tentang potensi antimalaria dari *M. citrifolia*, hal tersebut merupakan faktor yang melatarbelakangi diadakannya penelitian ini. Selain itu, kemampuan dari *M. citrifolia* yang dapat meningkatkan imunitas terhadap suatu penyakit. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk mengetahui potensi antimalaria *M. citrifolia* sebagai antiplasmodia dan imunomodulator terhadap penyakit malaria.

Penelitian ini bertujuan untuk: (i) mengetahui pengaruh ekstrak buah *M. citrifolia* terhadap angka parasitemia mencit setelah diinfeksi *P. berghei*, (ii) mengetahui pengaruh ekstrak buah *M. citrifolia* terhadap jumlah makrofag intraperitoneal yang memfagositosis lateks setelah diinfeksi *P. berghei* pada mencit.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama dua bulan, yaitu mulai dari bulan Maret s.d. April 2004, di Laboratorium Eksperimental Farmakologi Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi dan Obat Tradisional Litbang Depkes RI, Jakarta dan Laboratorium Imunopatologi, Departemen Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

### Bahan dan alat

**Bahan hewan uji.** Hewan uji berupa mencit jantan galur swiss, dengan berat badan 25-35 g, dan berumur antara 6-8 minggu. Bahan makanan mencit digunakan pakan mencit BR I.

**Bahan tanaman.** Bahan tanaman berupa buah *M. citrifolia* didapat dari Perkebunan Toga Saridatra, Banjar Arum, Kalibawang, Kulon Progo.

### Cara kerja

### Rancangan percobaan

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Percobaan pertama bertujuan melihat jumlah parasitemia menggunakan 5 perlakuan dengan masing-masing 5 ulangan, sedangkan percobaan kedua bertujuan melihat persentase fagositosis makrofag menggunakan 4 perlakuan masing-masing 6 ulangan.

### Pengambilan tanaman

Buah *M. citrifolia* yang sudah matang dan segar dengan warna sedikit cerah.

### Pembuatan ekstrak buah *M. citrifolia*:

Buah *M. citrifolia* dibersihkan, diiris tipis-tipis dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40° C, kemudian digiling halus menggunakan blender. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode perkolasi. Serbuk kering buah *M. citrifolia* direndam dengan larutan etanol 95% dalam gelas beker selama 3 jam, kemudian dipindahkan dengan hati-hati ke dalam perkolator sambil ditekan, dan ditambah larutan penyari etanol 70%, lalu didiamkan selama 24 jam. Perkolat akan menetes dari kran yang telah dibuka. Perkolasi dihentikan jika cairan sudah tidak pekat atau lebih jernih. Perkolat dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C, lalu dikeringkan dengan oven hingga menjadi ekstrak kering.

### Pemeliharaan mencit

Sebelum dilakukan perlakuan mencit, diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 1 minggu. Proses inokulasi atau transfer *P. berghei* pada mencit: Proses transfer *P. berghei* didapat dari mencit donor yang sudah diinfeksi. Tiga ekor mencit donor diambil darahnya dari sinus orbitalis menggunakan kapiler hematokrit yang terlebih dahulu diberi heparin, lalu ditampung dalam tabung. Ketiga darah tersebut dikocok, kemudian dihitung angka parasitemianya jika mencapai 2-3%, maka sudah dapat diinfeksi ke mencit yang lain, selanjutnya pada setiap mencit disuntikkan darah yang mengandung *P. berghei* sebanyak 0,1 mL secara peritoneal (Dewi *et al.*, 1996).

### Perlakuan pada hewan uji

Mencit dibagi 2 kelompok besar berdasarkan jenis percobaan. Kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan dosis perlakuan dan kontrol. Kelompok pertama dengan metode 7 hari test untuk melihat angka parasitemia dengan metode pemberian dilakukan secara peroral:

- kelompok I : dosis 200 mg/kg BB
- kelompok II : dosis 150 mg/kg BB
- kelompok III : dosis 100 mg/kg BB
- kelompok IV : kontrol positif menggunakan fansidar 20 mg/kg,
- kelompok V : kontrol negatif hanya diberikan akuades

Kelompok kedua dilakukan selama 4 hari, tanpa diberikan kontrol positif karena fansidar hanya bersifat antiplasmodia, kelompok ini bertujuan untuk mengetahui persentase fagositosis makrofag yang dilakukan secara peroral:

- kelompok I : dosis 200 mg/kg BB
- kelompok II : dosis 150 mg/kg BB
- kelompok III : dosis 100 mg/kg BB
- kelompok IV : kontrol hanya menggunakan akuades

Penentuan dosis tersebut didasarkan pada penelitian Murray (2000), untuk ekstrak buah *M.*

*citrifolia* mempunyai dosis aman untuk manusia antara 500-1000 mg per hari. Dosis tersebut dikonversikan terlebih dahulu untuk penentuan dosis mencit dengan angka konversi 0,0026, hasil yang didapat sebesar 91-182 mg/kg BB.

Dalam penelitian ini digunakan dua perlakuan. Perlakuan pertama dilakukan menggunakan tes 7 hari, yaitu 7 hari pengamatan angka parasitemia dengan pemberian ekstrak buah *M. citrifolia* selama 3 hari berturut-turut (Dewi *et al.*, 1996). Perlakuan kedua yang ditujukan untuk pengamatan makrofag yaitu 4 hari diberikan ekstrak *M. citrifolia*, kemudian hari terakhir diamati, karena melakukan dua perlakuan yang berbeda maka populasi mencit yang digunakan juga berbeda.

### Pemeriksaan pada hewan uji

Dilakukan pemeriksaan angka parasitemia setiap hari sampai hari ke-7, dengan membuat sediaan darah tipis dan tebal. Pemeriksaan tersebut dilakukan dengan memotong ujung ekor mencit. Selain itu, dilakukan perhitungan kemampuan fagositosis dari sel makrofag pada perlakuan 4 hari pemberian bahan uji, yaitu pada hari akhir mencit dibunuh dan diambil sampel cairan peritoneal.

**Analisis angka parasitemia.** Perhitungan parasit digunakan metode apus darah Giemsa. Darah perifer dalam volume 1,0-1,5 mikroliter diambil kemudian dibuat preparat apus darah metode tipis dan tebal dengan metode pewarnaan Giemsa yang sudah diberi buffer. Perhitungan parasitemia dilakukan secara manual dengan menghitung prosentase jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei* dalam 1000 sel darah merah (Kakkilaya, 2002).

**Analisis fagositosis makrofag.** Dalam melakukan analisis fagositosis makrofag menurut (Fitriani, 2002) yang telah dimodifikasi oleh (Kusmardi, 2004) dilakukan dua cara yaitu mengisolasi makrofag dan pemeriksaan fagositosis makrofag dengan lateks.

**Isolasi makrofag.** Sebelum dibunuh mencit disuntik larutan garam fisiologis sebanyak 3 mL pada daerah intraperitoneal. Mencit dibunuh menggunakan dietileter, lalu dibaringkan telentang dan kemudian disuntikkan kembali garam fisiologis sebanyak 3 mL. Membuat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting, setelah terlihat peritoneal, dengan jarum suntik 5 mL cairan intraperitoneal diambil sebanyak 5 mL. Cairan intraperitoneal sebanyak 5 mL tersebut dipindahkan ke dalam tabung dan kemudian disentrifuge 1600 rpm selama 5 menit, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali. Proses selanjutnya adalah proses purifikasi makrofag, natan dari hasil sentrifuge di atas dimasukkan ke dalam wadah plastik yang disebut botol *flush*, botol *flush* tersebut sudah berisi medium RPMI. Kemudian diinkubasi selama satu malam pada inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37° C. Setelah melewati satu malam, proses purifikasi dilanjutkan dengan membuang medium RPMI dari botol *flush*, dan menambahkan serum dan ditunggu selama 15 menit untuk melepas sel – sel makrofag

yang menempel pada dinding plastik botol *flush*. Selanjutnya dilakukan proses pembiakan atau kultur yang dimulai dengan memindahkan larutan serum dengan sel-sel makrofag tersebut ke dalam tabung, dan kemudian disentrifuge 1600 rpm selama 5 menit. Kemudian dihitung dengan hemacytometer, untuk mengetahui jumlah sel makrofag yang akan dikultur. Natan hasil sentrifuge tersebut, dengan jumlah sel makrofag rata-rata  $5 \times 10^5$  sel dipindahkan ke dalam botol *flush* untuk dikultur. Sebelumnya botol *flush* sudah diberi medium lengkap (RPMI yang ditambahkan *Fungizone*, dan *Serum* 10%). Proses mengkultur dilanjutkan dengan menginkubasi pada CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam.

**Pemeriksaan fagositosis makrofag dengan lateks.** Suspensi makrofag yang sudah dikultur dipindahkan ke dalam tabung, kemudian botol *flush* diberi serum kembali untuk mendapatkan makrofag yang cukup banyak, setelah itu dicuci dengan RPMI. Setelah dicuci dengan RPMI, larutan sel-sel makrofag diberikan suspensi Lateks, lalu didiamkan selama 5 menit. Jumlah sel makrofag yang memfagositosis lateks dihitung menggunakan hemacytometer.

**Pengamatan gejala klinis.** Pengamatan ini dilakukan dengan melihat keadaan fisik dan berat badan mencit selama 7 hari berturut-turut.

#### Analisis data

Analisis yang digunakan adalah kuantitatif dan kualitatif. Analisis kuantitatif digunakan dalam pengamatan data primer, yaitu angka parasitemia dan persentase fagositosis makrofag. Data angka parasitemia dianalisis sidik ragam menggunakan uji ANOVA dua arah, kemudian dilakukan uji lanjut LSD bila ada perbedaan yang nyata. Sedangkan data persentase jumlah makrofag akan dianalisis dengan ANOVA satu arah, kemudian dilakukan uji lanjut Duncan dan SNK. Data kualitatif seperti berat badan mencit akan dijadikan data pendukung.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penurunan angka parasitemia saat pemberian ekstrak buah *M. citrifolia*

Penghitungan angka parasitemia mencit merupakan metode yang biasa digunakan dalam penelitian malaria. Fungsi dari penghitungan ini adalah untuk menentukan positif tidaknya seekor mencit setelah diinfeksi melalui intraperitoneal sel darah merah yang telah terinfeksi *P. berghei*. Selain itu, juga dapat diketahui berapa angka parasitemia mencit tersebut. Parasitemia ialah persentase jumlah sel darah merah yang terinfeksi oleh *P. berghei*

dalam 1000 sel darah merah. Metode ini dapat dilakukan dengan mengamati sel darah merah dalam preparat apus darah yang dibuat menggunakan metode pewarnaan giemsa. Pewarnaan giemsa merupakan pewarnaan yang paling sering digunakan karena berfungsi membedakan antara sel darah merah yang terinfeksi dan yang tidak terinfeksi. Dengan demikian maka, penghitungan angka parasitemia dari mencit dapat digunakan untuk mengetahui penambahan jumlah *P. berghei*. Perlakuan yang diberikan pada hewan uji menggunakan metode 7 hari pengamatan angka parasitemia, dengan pengobatan selama 3 hari berturut-turut. Hal tersebut sesuai keputusan Departemen Kesehatan RI tahun 1995. Metode ini bertujuan untuk mengetahui bahan atau obat yang diberikan dapat dijadikan obat penyakit malaria.

Tabel 1. menunjukkan bahwa pada semua kelompok di hari pertama mempunyai angka parasitemia yang mendekati seragam, yaitu antara 3-4%. Hal ini karena penyuntikan darah dengan jumlah yang sama pada saat transfer *P. berghei*, sehingga jumlah parasit pada darah mempunyai rata-rata yang sama. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Murdiani (2000), yang memberitahukan bahwa dengan menginjeksi darah yang terinfeksi *P. berghei* sebanyak 0,1 mL didapat rata-rata jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei* antara 2-3% angka parasitemia pada hari pertama.

Tabel 1. menunjukkan bahwa secara umum pada kelompok I dan II mengalami penurunan sampai pada hari ke-5. Pada hari ke-5 angka parasitemia berturut-turut menjadi sebesar 3,576% dan 4,107%. Sedangkan, pada hari ke-6 dan ke-7 terjadi peningkatan jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei*. Terjadinya penurunan yang dialami oleh kelompok I dan II, disebabkan adanya pemberian ekstrak buah *M. citrifolia* selama 3 hari, yang dapat menurunkan dan menahan laju pertumbuhan sampai dengan hari ke-5. Sedangkan pada hari ke-6 sampai hari ke-7 terjadi peningkatan jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei*, hal ini karena sudah tidak diberikan ekstrak buah *M. citrifolia*. Penurunan pada hari ke-5 sekitar 3-4%, jumlah ini dianggap masih dapat meningkatkan jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei*. Karena menurut Dewi *et al.*, (1996), angka parasitemia yang dianggap positif jika mempunyai

**Tabel 1.** Jumlah rata-rata angka parasitemia (%) selama 7 hari.

	Kel I	Kel II	Kel III	Kel IV	Kel V
Hari 1	4,296±0,687	4,301±0,776	3,926±0,796	3,921±0,683	4,644±0,834
Hari 2	14,014±5,63	8,967±5,674	11,341±2,736	1,777±0,208	15,08±6,239
Hari 3	9,688±3,350	13,798±8,732	11,685±5,121	1,431±0,308	16,862±6,883
Hari 4	4,941±1,147	8,469±6,624	11,554±3,564	0,552±0,213	18,367±7,965
Hari 5	3,576±0,543	4,109±0,526	13,331±3,523	0,299±0,116	21,399±3,918
Hari 6	14,962±1,719	7,991±1,619	23,952±5,730	0,275±0,068	21,821±2,077
Hari 7	24,301±3,853	16,363±2,975	28,044±2,513	0,201±0,078	24,259±1,858

Keterangan: kelompok I: dosis 200 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* kelompok II: dosis 150 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* kelompok III: dosis 100 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* kelompok IV: kontrol positif menggunakan fansidar, kelompok V: kontrol negatif hanya diberikan akuades.

angka parasitemia minimal 2-3%. Oleh sebab itu, dengan jumlah sel darah merah yang terinfeksi oleh *P. berghei* lebih besar dari 2-3%, maka akan memudahkan *P. berghei* dapat berkembang lagi tanpa adanya pemberian ekstrak buah *M. citrifolia*.

Kelompok III yang merupakan dosis terkecil, pada kelompok ini tidak menunjukkan adanya penurunan angka parasitemia. Hal tersebut terlihat antara hari ke-2 sampai hari ke-4 angka parasitemia mempunyai nilai rata-rata yang hampir sama yaitu berkisar 11%. Kemudian angka parasitemia meningkat hingga menjadi 28,044% di hari ke-7. Hal tersebut lebih disebabkan kecilnya jumlah pemberian dosis ekstrak yang diberikan kepada mencit yang terinfeksi malaria *P. berghei*, sehingga dosis tersebut tidak dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei*.

Kelompok IV menggunakan perlakuan dengan fansidar. Pada kelompok ini di hari ke-2 sudah terlihat penurunan sebesar 2,144% dengan jumlah awal pada hari pertama rata-rata sebesar 3,921% yang kemudian menjadi 1,772% pada hari ke-2. Pada hari keempat tercatat persentase parasitemia mencapai rata-rata 0,552%. Setelah hari ke-4 penurunan masih terjadi hingga hari ke-7 dengan nilai 0,201%. Sebagaimana yang telah diketahui, fansidar merupakan obat malaria yang biasa digunakan dan relatif aman (Basco *et al.*, 2001). Maka sudah sepantasnya didapatkan hasil yang terbukti menurunkan angka parasitemia hingga 0,201% pada nilai terendah.

Kelompok V merupakan kelompok kontrol yang hanya diberikan akuades. Pada kelompok ini tidak terjadi penurunan, tetapi yang terjadi adalah peningkatan angka parasitemia. Pada hari ke-2 terjadi peningkatan 10,436% yang mengubah angka parasitemia menjadi 15,080%. Peningkatan tersebut terus terjadi hingga hari ke-7 yang mempunyai angka parasitemia sebesar 24,259%. Dikarenakan hanya akuades yang diberikan pada mencit kelompok ini maka angka parasitemia pada kelompok ini terus meningkat. Pada hari ke-5 salah satu mencit dari kelompok ini mati, hal tersebut dapat terjadi karena akuades tidak dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei*, sehingga terjadi kematian pada mencit tersebut.

Kematian yang terjadi pada kelompok V sesuai dengan penelitian yang sudah pernah dilakukan oleh Dewi *et al.* (1997) mengatakan bahwa kematian mencit lebih dipengaruhi oleh tingkatan pasase atau proses transfer parasit dari mencit ke mencit. Semakin tinggi tingkat pasasennya maka tingkat virulensi parasit tersebut semakin ganas. Pada penelitian ini digunakan pasase pertama, kematian terjadi pada hari ke-5. Hal tersebut sama seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Dewi *et al.*, (1997) yaitu banyak kematian terjadi pada hari ke-5 dan ke-6.

Selain itu, dalam hubungan antara angka parasitemia dengan tingkat anemia, menurut Richards *et al.*, (1998) mengatakan bahwa dari 148 penderita malaria akut *P. falciparum*, dengan 75% mempunyai angka parasitemia kurang dari 1%, dan 24% penderita malaria lainnya mempunyai angka

parasitemia antara 1-5%. Pada 148 penderita malaria tersebut didapat jumlah penderita yang anemia sebanyak 15%. Berdasarkan data di atas narasumber mengatakan bahwa anemia tidak ada hubungannya dengan jumlah parasitemia. Dewi *et al.*, (1996) menambahkan bahwa semakin lama mencit terinfeksi malaria *P. berghei* maka anemia yang dialami mencit tersebut semakin berat. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin di hari ke-5 pada mencit yang terinfeksi *P. berghei*. Mencit normal pada penelitian tersebut mempunyai jumlah eritrosit sebesar 4,3 juta/ $\mu$ L dan mempunyai kadar hemoglobin sebesar 12,89 g/dl, sedangkan mencit yang terinfeksi *P. berghei* mempunyai jumlah 2,7 juta/ $\mu$ L dengan kadar hemoglobin sebesar 7,73 g/dl.

Data perubahan angka parasitemia tiap harinya dianalisis menggunakan statistik dengan uji ANOVA dua arah, yaitu perubahan angka parasitemia sangat dipengaruhi oleh pemberian dosis dan perubahan hari. Setelah dianalisis didapat nilai signifikansi ( $P < 0,05$ ). Hal tersebut berarti bahwa adanya perbedaan pada kelompok I, II, III dan kelompok kontrol negatif serta kelompok kontrol positif. Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan yang nyata maka data tersebut dianalisis dengan Uji LSD.

Hasil analisis statistik uji LSD menunjukkan bahwa selama pemberian ekstrak buah *M. citrifolia* dengan dosis 200 dan 150 mg/kg BB dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei* dengan menurunkan angka parasitemia, karena mempunyai signifikansi ( $P < 0,05$ ) terhadap kelompok V (kelompok pemberian akuades). Pada dosis 100 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* tidak dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei*. Walaupun pada saat pemberian ekstrak dosis 200 dan 150 mg/kg BB mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *P. berghei* dengan menurunkan angka parasitemia, tetapi kedua dosis ini tidak dapat dikatakan sebagai bahan untuk pengobatan malaria. Karena kedua dosis ini tidak satupun yang dapat menurunkan sebaik kelompok perlakuan dengan fansidar, atau dengan kata lain kedua dosis tersebut tidak mempunyai efek yang sama dengan obat malaria yang biasa digunakan yaitu fansidar. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai signifikansi kelompok I dan II ( $P < 0,05$ ) terhadap kelompok IV atau kelompok pemberian fansidar.

Menurut Keyser *et al.*, (2000) tiap bahan atau obat antimalaria mempunyai mekanisme penghambatan yang spesifik, begitu pula senyawa-senyawa yang berasal dari tumbuhan. Sebagai perbandingan, obat Fansidar yang tersusun dari senyawa pirimetamin dan sulfodoksin. Kedua senyawa ini menurut Gatton *et al.*, (2004) berfungsi sebagai penghambat kerja dua enzim fungsional pada biosintesis senyawa folat parasit. Enzim tersebut adalah *dihydrofolate reductase* dan *dihydropteroate synthetase*.

Menurut Hunter *et al.*, (2003) senyawa folat memegang peranan penting dalam pertumbuhan sel, jalur metabolisme, termasuk sintesis DNA dan RNA, serta pembentukan protein dari asam amino.

Karena pentingnya enzim dihydrofolate reductase dalam metabolisme, maka enzim ini sering menjadi target dari obat antibakteri, dan penyakit yang disebabkan oleh parasit sebagai contoh malaria.

Enzim *dihydrofolate reductase* ialah enzim yang sangat berperan dalam pembentukan tetrahydrofolat (THF). THF tersebut adalah bentuk aktif dari senyawa folat atau asam folat. Folat akan mengalami penambahan 2 atom H menjadi dihydrofolat, yang kemudian dihydrofolat akan mengalami penambahan 2 atom H menjadi tetrahydrofolat. Kedua reaksi tersebut dapat terjadi karena adanya enzim *dihydrofolate reductase* (McKee and McKee, 1999).

Pada ekstrak buah *M. citrifolia* belum diketahui secara spesifik bagaimana ekstrak ini dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei*. Tetapi penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Koumaglo *et al.*, (1992) memberitahukan bahwa pertumbuhan *P. falciparum* dapat dihambat dengan pemberian tiga senyawa yaitu digitolurein, rubiadin-1-metil, dan damnakantal pada ekstrak kulit tangkai dan kulit akar *M. lucida* secara *in vitro*. Kayser *et al.*, (2000) menambahkan bahwa pada senyawa tersebut terdapat gugus aldehyd yang berikatan pada atom C no.2, sebagaimana telah diketahui bahwa senyawa aldehyd ini lebih sering berfungsi sebagai senyawa yang sitotoksik. Dari sumber yang sama pula disebutkan bahwa struktur planar senyawa damnakantal merupakan penyebab senyawa tersebut mempunyai potensi untuk menghambat pertumbuhan dari *P. falciparum* secara *in vitro*. Hal tersebut karena senyawa tersebut mempunyai struktur siklik planar yaitu struktur yang berpotensi sebagai DNA-interkalator. Menurut Elkins (1998) dalam buah *M. citrifolia* terkandung senyawa damnakantal. Jadi kemungkinan terbesar, senyawa yang berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan *P. berghei* pada sel darah mencit adalah senyawa damnakantal.

Senyawa-senyawa lain seperti camptotekin, netropsin dan saintopin juga telah diketahui mempunyai fungsi sebagai DNA-interkalator (Knab *et al.*, 1995). Senyawa-senyawa tersebut terbukti dapat mengatur dan bahkan kerja dari senyawa yang berfungsi sebagai DNA-interkalator dapat berlawanan dengan fungsi enzim katalis Topoisomerase I dan II (Capranico *et al.*, 1990). Menurut Albert *et al.*, (1983) DNA topoisomerase merupakan enzim yang terpenting dalam replikasi DNA. Walaupun tidak sepenting enzim DNA polymerase tetapi dengan tidak berfungsinya enzim ini maka peristiwa replikasi DNA tidak akan berlangsung dan pembelahan sel tidak akan terjadi.

Secara umum replikasi DNA adalah terbelah atau terbukanya rantai ganda dari DNA yang kemudian terjadi polymerisasi rantai DNA baru. Tetapi sebelum hal tersebut terjadi, kadang terjadi suatu "winding problem" atau yang disebut masalah dalam lilitan strain DNA. Masalah tersebut umumnya disebabkan oleh tidak teraturnya gulungan atau lilitan strain DNA yang kemudian dapat menjadi kusut. Strategi alternatif yang biasa dipakai untuk

menyelesaikan masalah ini adalah dengan adanya enzim DNA topoisomerase (Albert *et al.*, 1983).

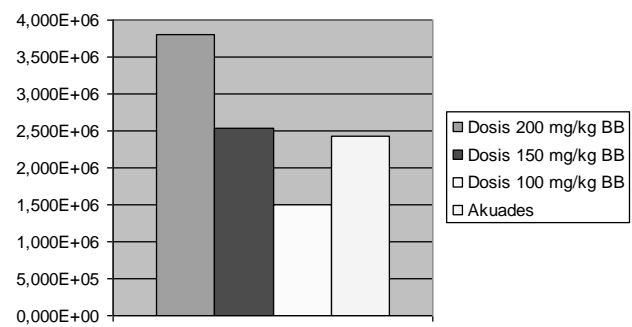
Enzim DNA topoisomerase merupakan enzim penting untuk proses replikasi DNA dan pembelahan sel. Dihambatnya fungsi enzim tersebut maka kemungkinan terbesar adalah proses tersebut tidak akan terjadi. Penghambatan pertumbuhan pada *P. falciparum* pada penelitian Koumaglo *et al.*, (1992) disebabkan oleh adanya ketiga senyawa yang berpotensi sebagai DNA-interkalator.

Pada buah *M. citrifolia* terdapat senyawa damnakantal yang diketahui berpotensi sebagai DNA-interkalator. DNA interkalator mempunyai fungsi yang antagonis dengan enzim topoisomerase I dan II. Jadi senyawa damnakantal ekstrak buah *M. citrifolia* dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei* dengan menghambat fungsi enzim topoisomerase I dan II pada proses sintesa protein *P. berghei*.

#### Peningkatan jumlah makrofag yang memfagositosis lateks setelah pemberian ekstrak buah *M. citrifolia*

Pengamatan aktivitas makrofag yang memfagositosis lateks bertujuan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan dari ekstrak buah *M. citrifolia* sebagai bahan imunomodulator. Sebagaimana yang telah diketahui bahwa makrofag merupakan salah satu sel fagosit yang berperan penting pada saat pertama kali terjadi invasi oleh *P. berghei* terhadap sel darah merah mencit. Penelitian oleh Nogami *et al.*, (1998) membuktikan bahwa kehilangan Reseptor Pencari Tipe A (*Macrophage Scavenger Receptor A*) pada sel makrofag akan lebih cepat mengalami kematian dibandingkan dengan mencit yang normal. Hal tersebut membuktikan bahwa fungsi dari makrofag tersebut sangatlah penting untuk mempertahankan tubuh dari invasi parasit.

Pengamatan makrofag ini dilakukan dengan cara mengkultur makrofag intraperitoneal mencit, yang diinduksi dengan lateks. Lateks tersebut berfungsi sebagai antigen, sehingga diharapkan makrofag tersebut dapat memfagositosis lateks. Setelah itu dilakukan penghitungan menggunakan hemasitometer. Kriteria penghitungan makrofag yang memfagositosis berdasarkan hasil pengamatan pada mikroskop, yaitu mengamati makrofag yang menempel atau sudah memakan lateks.



**Gambar 1.** Rata-rata jumlah makrofag yang aktif memfagositosis lateks dalam sel/ml.

Gambar 1. memperlihatkan bahwa adanya perbedaan jumlah makrofag yang memfagosit lateks antara kelompok mencit yang diberikan ekstrak buah *M. citrifolia* dengan mencit tanpa pemberian ekstrak buah *M. citrifolia* setelah diinfeksi *P. berghei*. Pada dosis 200 mg/kg BB didapat rata-rata  $3,8 \times 10^6$  sel makrofag yang memfagosit lateks. Pada dosis 150 mg/kg BB didapat rata-rata  $2,53 \times 10^6$  sel makrofag yang memfagosit lateks. Dosis yang ketiga yaitu 100 mg/kg BB jumlah rata-rata sel makrofag yang memfagosit lateks sebanyak  $1,5 \times 10^6$  sel makrofag, sedangkan pada kelompok akuades didapat jumlah rata-rata sel makrofag yang memfagosit lateks sebesar  $2,43 \times 10^6$  sel makrofag.

Dosis 200 mg/kg BB mencit memberikan jumlah rata-rata makrofag yang memakan lateks terbesar, kemudian dosis 150 mg/kg BB. Tetapi pada dosis 100 mg/kg BB, peningkatan aktivitas tersebut tidak terlihat, karena jumlah makrofag yang memfagosit lateks kurang dari kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 200 mg/kg BB dan 150 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* merupakan dosis yang dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit setelah diinfeksi *P. berghei*. Pada kelompok kontrol didapat jumlah makrofag yang memfagosit lateks lebih besar dari kelompok dosis 100 mg/kg BB. Hal ini disebabkan oleh banyaknya antigen pada kelompok kontrol yang berfungsi sebagai induktor untuk meningkatkan fungsi fagositosis dari makrofag, sedangkan pada kelompok dosis 100 mg/kg BB disebabkan dosis yang kecil yang menyebabkan aktivitas makrofag untuk memfagosit lateks tidak sebaik dosis 200 ataupun 150 mg/kg BB.

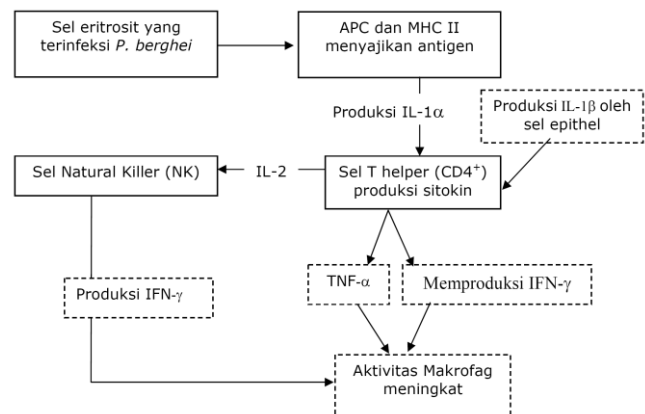
Data yang didapat dari perhitungan secara statistik menunjukkan bahwa seluruh sampel yang berjumlah 12 mempunyai nilai jumlah makrofag yang aktif memakan lateks terdistribusi normal. Hal tersebut ditunjukkan dengan Test Kolmogorov-Smirnov. Dua belas sampel tersebut setelah dianalisis dengan ANOVA satu arah didapat nilai signifikansi sebesar 0,006. Hal tersebut menunjukkan bahwa dari beberapa kelompok yang telah diteliti mempunyai perbedaan yang nyata.

Setelah mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok secara nyata, maka data tersebut dianalisis menggunakan uji homogenous Duncan dan SNK (Student-Newman-Keuls). Hasil yang didapat dari analisis masing-masing uji menyatakan hal yang sama, yaitu jumlah makrofag yang memfagositosis setelah pemberian dosis II dan III tidak mempunyai perbedaan dengan kelompok kontrol. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai signifikansi sebesar 0,110 untuk Uji SNK dan 0,056 untuk Uji Duncan.

Uji Duncan dan SNK tersebut memberikan informasi selanjutnya dari data yang telah dianalisis dengan ANOVA satu arah, yaitu menunjukkan kelompok yang paling signifikan hasilnya setelah diberikan perlakuan-perlakuan tersebut. Hasil analisis didapat, dari keempat kelompok perlakuan

hanya kelompok I yang menunjukkan signifikansi pada  $p = 0,006$ . Dengan demikian, kelompok I atau dosis 200 mg/Kg BB dapat dikatakan sebagai dosis yang mampu meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag terhadap lateks dibandingkan dengan kelompok IV atau kelompok yang hanya diberikan akuades, sedangkan kelompok dosis 150 dan 100 mg/kg BB belum dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag terhadap lateks.

Peningkatan aktivitas makrofag mencit setelah diberikan ekstrak buah *M. citrifolia* disebabkan adanya peningkatan sekret sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel imunokompeten, antara lain Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan dari Hirazumi dan Furusawa (2000) yang mengatakan bahwa ekstrak buah *M. citrifolia* meningkatkan sekresi dari IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , dan interferon  $\gamma$ . Menurut Kresno (2001) dari beberapa sitokin tersebut, IL- $1\beta$  merupakan sitokin yang dapat mempengaruhi proliferasi sel T helper ( $CD4^+$ ). Selain itu mikroorganisme intraseluler dapat diketahui oleh APC atau makrofag bersama dengan MHC kelas II untuk mengekspresikan antigen serta mensekresi IL- $1\alpha$  yang dapat mempengaruhi proliferasi sel T helper ( $CD4^+$ ). Sel T helper tersebut kemudian mensekresi beberapa sitokin, menurut Greenberg *et al.*, (2001) sel T helper tipe 1 (Th1) pada saat infeksi malaria mensekresi sitokin antara lain IFN- $\gamma$ , IL-2, dan TNF- $\alpha$ . Dengan adanya sitokin-sitokin yang merupakan faktor pengaktif sel makrofag, maka aktivitas fagositosis makrofag dapat ditingkatkan (Gambar 2).



**Gambar 2.** Skema mekanisme peningkatan aktivitas fagositosis makrofag setelah pemberian ekstrak buah *M. citrifolia* L menurut beberapa sumber. Keterangan:  Dipengaruhi oleh senyawa polisakarida buah *M. citrifolia*.

Selain itu menurut Kuby (1997) makrofag teraktivasi oleh adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh. Subowo (1993) mengatakan bahwa senyawa polisakarida murni dapat direspon dengan baik oleh sistem imun pada mencit dan manusia. Antigen polisakarida yang sederhana adalah dextran dan levan. Pada ekstrak buah *M. citrifolia* terdapat senyawa polisakarida yang berfungsi sebagai peningkat aktivitas sel makrofag. Dengan adanya pernyataan diatas dapat dikatakan bahwa senyawa

**Tabel 2** Rata-rata perubahan berat badan (g) mencit selama 7 hari.

	Kel I	Kel II	Kel III	Kel IV	Kel V
Hari 1	33,8±5,263	34,6±3,435	34,4±3,361	32,0±4,528	32,0±2,915
Hari 2	34,0±3,742	34,0±3,317	34,4±3,647	32,4±4,159	32,2±3,033
Hari 3	33,4±4,505	34,8±3,033	35,4±3,130	34,0±3,674	31,6±2,510
Hari 4	33,2±3,701	35,0±3,317	35,8±3,271	36,6±3,130	32,2±1,643
Hari 5	35,8±3,114	35,4±3,130	35,6±3,209	37,2±2,949	32,7±2,217
Hari 6	36,2±2,683	35,6±3,049	34,8±3,564	36,2±2,775	33,0±2,309
Hari 7	36,6±3,130	36,4±2,966	34,4±2,881	38,2±5,450	32,5±1,915

Keterangan: kelompok I: dosis 200 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* kelompok II: dosis 150 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* kelompok III: dosis 100 mg/kg BB ekstrak buah *M. citrifolia* kelompok IV: kontrol positif menggunakan fansidar, kelompok V: kontrol negatif hanya diberikan akuades.

polisakarida dari ekstrak buah *M. citrifolia* dianggap suatu antigen oleh mencit.

#### Berat badan sebagai indikator keadaan penyakit malaria

Berat badan merupakan salah satu indikator yang memperlihatkan bagaimana keadaan penyakit malaria. Secara umum, pada keadaan terinfeksi *P. berghei*, berat badan mencit akan menurun seiring dengan meningkatnya jumlah sel darah merah yang terinfeksi oleh *P. berghei*. Jadi dengan mengamati perubahan berat badan mencit, diharapkan dapat mengetahui hubungannya dengan perubahan angka parasitemia pada mencit. Pengambilan data perubahan berat badan digunakan untuk menunjang data perubahan angka parasitemia pada mencit.

Pada Tabel 2. semua kelompok mengalami peningkatan berat badan, jika dibandingkan antara hari pertama dengan hari ke-7, kecuali kelompok III. Perubahan yang sangat mencolok adalah pada kelompok IV yaitu meningkat sekitar 6,2 gram dalam tujuh hari. Demikian pula kelompok I dan II terjadi peningkatan berat badan dalam tujuh hari. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa angka parasitemia atau jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei* dapat mempengaruhi perubahan berat badan mencit.

Dengan melihat hasil yang didapat antara angka parasitemia dengan jumlah makrofag yang memfagositosis lateks setelah infeksi *P. berghei*, memberikan suatu pandangan baru kepada dunia pengobatan terhadap penyakit malaria. Penyakit malaria merupakan permasalahan penduduk dunia yang sering mengakibatkan kematian. Ekstrak buah *M. citrifolia* ini dimungkinkan akan dapat mengurangi permasalahan tersebut, karena ekstrak ini mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *P. berghei* yang ditunjukkan pada mencit. Selain itu, ekstrak ini bersifat imunomodulator yaitu dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, dengan meningkatnya kemampuan makrofag tersebut ekstrak buah *M. citrifolia* dapat memperlambat kematian yang diakibatkan oleh *P. berghei* pada mencit.

## KESIMPULAN

Ekstrak buah *M. citrifolia* dengan pelarut alkohol 70% pada dosis 200 mg dan 150 mg/kg BB, dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei* yaitu dengan menurunkan angka parasitemia pada hari ke-5 menjadi 3,576% dan 4,109%, walaupun mempunyai efek yang lebih rendah dari obat malaria fansidar. Ekstrak

buah *M. citrifolia* dengan pelarut alkohol 70% pada dosis 200 mg/Kg BB dapat meningkatkan jumlah makrofag yang memfagositosis lateks.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1983. *Molecular Biology of The Cell*. 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Garland Publishing.
- Ali, A.M, N.H. Ismail, M.M. Mackeen, L.S. Yazan, S.M. Mohamed, A.S.H. Ho and N.H. Lajis. 2000. antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of **Morinda elliptica** (abstract). *Pharmaceutical Biology* 38 (4): 298-301.
- Arbani P.R. 1991. Malaria control program in Indonesia. In: Salazar, N.P., T. Chongsuphajais, T. Harinasuta, and J. Karbwang (eds.). *Advanced Knowledge on Malaria in Southeast Asia*. Bangkok: Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. Seameo Tropmed Network.
- Awe, S.O., and J.M. Makinde. 1997. Evaluation of sensitivity of **Plasmodium falciparum** to **Morinda lucida** leaf extract sample using rabbit in vitro microtest tehniqe. *Indian Journal of Pharmacology*. 30: 51-53.
- Barcus, M.J., F. Laihah, M. Sururi, P. Sismadi, H. Marwoto, M.J. Bangs, and J.K. Baird. 2002. Epidemic malaria in the Menoreh Hills of Central Java (Abstract). *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 66 (3):287-292.
- Basco, L.K., A. Same-Ekobo, V.F. Ngane, M. Ndounga, T. Metoh, P. Ringwald, and G. Soula. 2002. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine and the sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine combination against uncomplicated **Plasmodium falciparum** malaria in young children in Cameroon. *Bulletin of the World Health Organization* 80: 538-545.
- Capranico G., K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1990. Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6611-6619.
- D'Alessandro, U. and H. Buttiens. 2001. History and importance of antimalarial drug resistance (abstract). *Tropical Medicine International Health* 6 (11):845-848.
- Departemen Kesehatan RI. 1994. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 1993*. Jakarta: Pusat Data Kesehatan.
- Departemen Kesesehatan RI. 1995. *Tes Resistansi untuk Plasmodium falciparum*. Jakarta. Direktorat Jendral PPM.
- Dewi, R.M., R.P. Jekti, dan A. Harijani. 1996. Keadaan hematologis mencit yang diinfeksi dengan

- Plasmodium berghei**. *Cermin Dunia Kedokteran* 106: 37-39.
- Dewi, R.M., R.P. Jekti, dan E. Sulaksono. 1997. Pengaruh pasase terhadap gejala klinis pada mencit strain Swiss Derived yang diinfeksi **Plasmodium berghei**. *Cermin Dunia Kedokteran* 106: 34-36.
- Dzulkarnain, B. 1998. *Tanaman-tanaman Antimalaria*. Jakarta: Puslitbang Farmasi, Balitbang Kesehatan, Depkes RI.
- Elkins, R, M.H. 1998. *Hawaiian Noni (Morinda citrifolia) Prize Herb of Hawaii and The South Pacific*. Woodland Publishing. Pleasant Grove, UT. [www.nutraceutical.com/educate/pdf/hawaiian\\_noni.pdf](http://www.nutraceutical.com/educate/pdf/hawaiian_noni.pdf)
- European Commision, 2002. *COST B9 Action on Chemotherapy of Protozoal infections (Report)*. Brussel: European Cooperation in The Field of Scientific and Technical Research.
- Fitriani, J. 2002. *Pengaruh Perasan Buah Morinda citrifolia terhadap Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C yang Diinokulasikan Listeria monocytogenes*. [Skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Gandahusada, S., D. Herny, and W. Pribadi. 2000. *Parasitologi Kedokteran*. Edisi ke-2. Jakarta. Fakultas Kedokteran UI.
- Gatton, M.L., L.B. Martin, and Q. Cheng. 2004. Evolution of Resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine in **Plasmodium falciparum**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* June 2004: 2116-2123.
- Greenberg, P.L., V. Gordeuk, S. Issaragrisil, N. Siritanaratkul, S. Fucharoen, and R.C. Ribeiro. 2001. Major hematologic diseases in the developing world new aspects of diagnosis and management of thalassemia, malarial anemia, and acute leukemia. *Hematology*: 479-498.
- Hirazumi, A. and E. Furusawa. 1999. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of **Morinda citrifolia** (Noni) with antitumour activity (Review). In: Blumenthal, M. *Noni Juice Fraction Shows Immunomodulatory and Potential Anti-tumor Activity in Rats*. Texas: HerbclipTM.
- Hunter W.N., M.S. Alphey, C.S. Bond, and A.W. Schuttelkopf. 2003. Targeting metabolic pathways in microbial pathogens: oxidative stress and anti-folate drug resistance in trypanosomatids. *Biochemical Society Transactions* 31 (3): C07-C10.
- Irwin, P.J. 1992. Respon imun terhadap parasit protozoa. In: Burgess, G.W. (ed). *Teknologi Elisa dalam Diagnosis dan Penelitian*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Jelinek, T., G. Peyerl-Hoffmann, N. Mühlberger, O. Wichmann, M. Wilhelm, N. Schmider, M.P. Grobusch, F. von Sonnenburg, J. Gascon, H. Laferl, C. Hatz, M. Alifrangis, G. Burchard, P. McWhinney, M. Schulze, H. Kollaritsch, S. da Cunha, J. Beøan, P. Kern, I. Gjørup and J. Cuadros. 2002. Molecular surveillance of drug resistance through imported isolates of **Plasmodium falciparum** in Europe. *Malaria Journal* 1: 11.
- Kakkilaya, B.S. 2002. *Peripheral Smear Examination for Malarial Parasite*. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site.
- Kayser, O., A. F. Kiderlen, and S.L. Croft. 2000. *Natural Products as Potential Antiparasitic Drugs*. [www.fu-berlin.de/akkayscr/antiparasiticsfromnature.pdf](http://www.fu-berlin.de/akkayscr/antiparasiticsfromnature.pdf)
- Knab A.M., J. Fertala, and M. Bjornsti. 1995. A camptothecin-resistant DNA topoisomerase I mutant exhibits altered sensitivities to other DNA topoisomerase poisons. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 270 (11): 6141-6148.
- Koumaglo, K., M. Gbeassor, O. Nikabu, C. de Souza, and W. Werner. 1992. Effects of three compounds extracted from **Morinda lucida** on **Plasmodium falciparum** (Abstract). *Planta Medica* 58 (6): 533-534.
- Kresno, S.B. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratoium*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Kuby, J. 1997. *Immunology*. 3<sup>rd</sup> edition. New York: W.H. Freeman and Company.
- Lawrence, M. 2000. *Enlisting a New Ally in The War Against Malaria*. In: Kumar, S. (ed). *Discovery a Publication of the Whitehead institute for biomedical Research*. Whitehead Institute.
- McKee, T. and McKee J. R. 1999. *Biochemistry: an Introduction*, 2<sup>nd</sup> edition. New York: McGraw-Hill Companies Inc.
- Murray, M. T. 2000. Noni juice - the passing of another panacea?. *Natural Medicine Online* 3 (2): 3.
- Najera, J.A. 1996. *Malaria Control Among refugees and displaced populations*. World Health Organization Division of Control of Tropical Diseases Malaria Unit.
- Noble, E.K. and G.A. Noble. 1989. *Parasitologi Biologi Parasit Hewan*. Penerjemah: Wadiarto. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Nogami, S., J. Watanabe, K. Nakagaki, K. Nakata, H. Suzuki, H. Suzuki, M. Fujisawa, T. Kodama, and S. Kojima. 1998. Short Report: Involvement of Macrophage Scavenger Receptors in Protection Against Murine Malaria. Japan: *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 59 (5): 843-845.
- Obih, P.O., J. Makinde, and O.J. Laoye. 1985. investigations of various extracts of *Morinda lucida* for antimalarial actions on *Plasmodium berghei* in mice (abstract). *African Journal Medical Medline Science* 14: 45-49.
- Reisberg, B. 1994. Malaria. In: Phair, J.P. and H.M. Sommers, (eds.). *Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi* Penerjemah: Wahab, S. 4<sup>th</sup> Edition. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Richards M.W., R.H. Behrens, and J.F. Doherty. 1998. Short report: hematologic changes in acute, imported **Plasmodium falciparum** malaria. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 59 (6): 859.
- Riley, E.M. 2000. The London School of Hygiene and Tropical Medicine: a New Century of Malaria Research. *Memio Instituto Oswaldo Cruz* 95: 25-32.
- Solomon, N. 1998. Recent scientific studies **Morinda citrifolia** (noni). In: *Buah Mengkudu dan Khasiatnya A Gift from Nature*. Bandar Lampung: Ekafood. [www.ekafood.com](http://www.ekafood.com).
- Sudarsono, P.N., D. Gunawan, S. Wahyuono, I.A. Donatus, dan Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II*. Yogyakarta: PSOT UGM, Deltomed, Java Plant.
- Wang, M.Y., B.J. West, C.J. Jensen, D. Nowicki, S.U. Chen, A.K. Palu, and G. Anderson. 2002. **Morinda citrifolia** (noni): a literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacologica Sinica* 23: 1127-1141.
- Yuliani, T. 2000. *Malaria, an Age Old Disease Proves Hard to Control*. London: Associated Press. [www.StopGettingSick.com](http://www.StopGettingSick.com).