

Aktivitas Antimalaria Ekstrak Air dan Etanol Tanaman Obat Berdasarkan Penghambatan Pembentukan β -Hematin

Yatri Hapsari^{*1}, Wien Kusharyoto¹, Partomuan Simanjuntak²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl Raya Bogor km 46, Cibinong, 16911, Indonesia

²Pusat Penelitian Kimia LIPI, Gd. 452 Kawasan PUSPIPTK, Serpong, Banten, 15314, Indonesia

*Alamat email penulis koresponden: hapsariyatri@gmail.com

Abstrak

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium sp.* melalui gigitan nyamuk *Anopheles sp.* betina. Salah satu mekanisme parasit yang dijadikan target pencarian obat antimalaria adalah mekanisme penghambatan pembentukan hemozoin. Plasmodium dalam siklusnya akan mendegradasi hemoglobin menjadi heme bebas yang toksik untuk dirinya sendiri. Untuk melindungi dirinya parasit akan mengubah heme bebas menjadi hemozoin. Senyawa β -hematin merupakan analog senyawa hemozoin. Pada penelitian ini diuji aktivitas antimalaria terhadap 13 ekstrak etanol metode maserasi (dingin) dan 13 ekstrak air metode dekok (panas). Tanaman yang digunakan adalah salam koja (*Murraya koenigii*), akar kuning (*Arcangelisia flava*), jung rahab (*Baeckea frutescens*), pule (*Alstonia scholaris*), buah makassar (*Brucea javanica*), bidara (*Ziziphus mauritiana*), mimba (*Azadirachta indica*), murbei (*Morus alba*), tabat barito (*Ficus deltoidea jack*), ceplikan (*Solidago virgaurea*), srigunggu (*Clerodendron serratum [L.] Sp r*), rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*), bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*). Pengujian menggunakan air panas dikarenakan cara masyarakat lokal dalam memanfaatkan tanaman obat akan dibandingkan dengan pelarut organik yang umum digunakan dalam penelitian. Ekstrak yang memiliki aktivitas terbaik diukur nilai IC_{50} dan dilanjutkan dengan skrining fitokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antimalaria lebih baik menggunakan pelarut air dengan metode dekok dibandingkan pelarut etanol dengan metode maserasi. Ekstrak yang aktivitasnya paling tinggi adalah ekstrak air daun jung rahab sebesar 58,48% dengan nilai IC_{50} sebesar 51,5 ppm. Skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak air daun jung rahab mengandung golongan senyawa flavonoid, saponin dan tanin.

Kata kunci: antimalaria, hemozoin, β -hematin, tanaman obat Indonesia

PENDAHULUAN

Malaria menjadi masalah utama kesehatan dunia dan bertanggung jawab terhadap kematian lebih dari 1 juta kematian per tahunnya. Peningkatan resistensi obat yang ada dan ekonomis merupakan hal yang utama. Sejarah menunjukkan bahwa tanaman merupakan sumber penting obat melawan malaria dengan dua obat utama digunakan untuk mengobati malaria, yaitu kuinin dan artemisinin yang keduanya diambil dari pengobatan tradisional dan tanaman. Obat tradisional merupakan sumber potensial pencarian senyawa baru sebagai obat malaria (Nguyen-Pouplin *et al.*, 2007). Salam koja (*Murraya koenigii*), akar kuning (*Arcangelisia flava*), jung rahab (*Baeckea frutescens*), pule (*Alstonia scholaris*), buah makassar (*Brucea javanica*), bidara (*Ziziphus*

mauritiana), mimba (*Azadirachta indica*), murbei (*Morus alba*), tabat barito (*Ficus deltoidea jack*), ceplikan (*Solidago virgaurea*), srigunggu (*Clerodendron serratum [L.] Sp r*), rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*), dan bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) merupakan tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat lokal. Salam koja (*Murraya koenigii*) yang memiliki aktivitas antiplasmodial terhadap *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium berghei* (Kamaraj *et al.*, 2014), ekstrak air akar kuning (*Arcangelisia flava*) memiliki aktivitas antiplasmodial terhadap *P. falciparum* 3D7 (Lovin *et al.*, 2012), sedangkan ekstrak air jung rahab (*Baeckea frutescens*) memiliki aktivitas antiplasmodium tergolong tinggi terhadap *P. falciparum* (Murnigsih *et al.*, 2005), ekstrak petroleum eter dan metanol dari pule (*Alstonia scholaris*) memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. berghei* (Gandhi dan Vinayak, 1990), ekstrak buah makassar (*Brucea javanica*) telah diketahui memiliki aktivitas antimalaria terhadap strain *P. falciparum* yang resisten klorokuin dan *P.berghei* (O'Neill *et al.*, 1987), ekstrak metanol bidara (*Ziziphus mauritiana*) diketahui memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* dan telah berhasil diisolasi senyawa alkaloid dari tanaman tersebut (Panseeta *et al.*, 2011), ekstrak metanol mimba (*Azadirachta indica*) memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* dan *P. berghei* (Abatan & Makinde, 1986), ekstrak metanol daun murbei (*Morus alba*) memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* 3D7 (Ariantari *et al.*, 2012), tabat barito (*Ficus deltoidea jack*) dimanfaatkan oleh masyarakat lokal sebagai pengobatan demam (Adam *et al.*, 2012) dan belum ada penelitian yang berkaitan dengan antimalaria, ceplikan (*Solidago virgaurea*), srigunggu (*Clerodendron serratum [L.] Sp r*), ekstrak metanol rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) memiliki aktivitas antimalaria dengan menghambat pertumbuhan *P. falciparum* (Mishra *et al.*, 2009), dan ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) memiliki kemampuan sebagai imunomodulator tetapi belum diteliti aktivitasnya sebagai antimalaria (Agysha *et al.*, 2018) merupakan tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat lokal. Ketiga belas jenis tanaman ini sudah banyak diteliti bioaktivitasnya, tetapi belum ada penelitian tentang aktivitas antimalaria berbasis penghambatan β -hematin.

Selama siklus intra-eritrosit, Plasmodium akan mendegradasi hemoglobin dalam eritrosit dan melepaskan heme bebas yang bersifat toksik baik bagi sel inang dan parasit sendiri. Tidak adanya enzim oksigenase, Plasmodium tidak dapat membelah heme menjadi tetrapirrol rantai terbuka di mana dibutuhkan ekskresi seluler. Untuk melindungi dirinya, Plasmodium mendetoksifikasi heme bebas salah satunya dengan kristalisasi menjadi hemozoin (Nhien *et al.*, 2011). Jalur inilah yang menjadi target untuk pencarian obat antimalaria, yaitu dengan menghambat pembentukan hemozoin. Klorokuin yang merupakan obat malaria memiliki mekanisme menurunkan laju pembentukan hemozoin dan bukan menghentikan pembentukannya (Egan dan Ncokazi, 2005), terakumulasi dalam vakuola makanan dan mencegah proliferasi parasit (Rush *et al.*, 2009). Secara *in vitro*, digunakan β -hematin yang merupakan senyawa analog hemozoin.

Pengujian aktivitas antimalaria yang dilakukan secara *in vitro* dengan mekanisme penghambatan β -hematin diharapkan akan dapat memberikan informasi mekanisme

antimalaria dari ekstrak tanaman yang diuji. Penelitian yang dilakukan pada daun sembung walaupun sebelumnya diketahui memiliki aktivitas antimalaria terhadap Plasmodium (Abdillah *et al.*, 2015) tetapi uji aktivitas antimalaria berbasis penghambatan β -hematin mengkonfirmasi mekanisme ekstrak daun sembung sebagai obat antimalaria (Septiana *et al.*, 2017).

Ekstraksi terhadap ketiga belas jenis tanaman dilakukan dengan dua perlakuan, yang pertama maserasi menggunakan etanol dan yang kedua perebusan menggunakan air (dekok). Hal ini bertujuan untuk membandingkan ekstraksi menggunakan pelarut organik dengan metode pemanfaatan tanaman obat yang biasa dilakukan masyarakat lokal terhadap aktivitas antimalaria. Ekstraksi menggunakan metode maserasi sendiri kelemahannya adalah memakan waktu yang lama bervariasi 2-10 hari (Trusheva *et al.*, 2007). Namun bila ada senyawa yang tidak tahan panas, metode ini dapat dipilih agar senyawa tersebut tidak rusak. Dekok merupakan metode ekstraksi yang sering dipergunakan bagi masyarakat dalam memanfaatkan tanaman obat, contohnya kunyit, tapi bila ada senyawa yang terkandung bersifat tidak tahan panas, tentunya efektivitasnya akan jauh berkurang (Dewi, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pelarut dan metode ekstraksi terhadap aktivitas antimalaria berbasis penghambatan β -hematin. Dengan membandingkan kedua metode ekstraksi ini diharapkan dapat memberikan informasi yang lebih baik mengenai aktivitas antimalaria dari ekstrak tanaman untuk penelitian selanjutnya.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI tahun 2016. Percobaan yang dilakukan meliputi ekstraksi etanol secara maserasi dan dekok salam koja (*Murraya koenigii*), akar kuning (*Arcangelisia flava*), jung rahab (*Baeckea frutescens*), pule (*Alstonia scholaris*), buah makassar (*Brucea javanica*), bidara (*Ziziphus mauritiana*), mimba (*Azadirachta indica*), murbei (*Morus alba*), tabat barito (*Ficus deltoidea jack*), ceplikan (*Solidago virgaurea*), srigunggu (*Clerodendron serratum [L.] Sp r*), rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*), bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) tanaman diperoleh dari CV. Bina Agro Mandiri, Bantul, Yogyakarta, dalam kondisi sudah kering, uji aktivitas antimalaria berbasis penghambatan β -hematin, skrining fitokimia dan nilai IC_{50} ekstrak tanaman dengan aktivitas antimalaria paling tinggi.

Ekstraksi 13 jenis tanaman

Pada ekstraksi maserasi menggunakan etanol, 100 gram simplisia tanaman yang sudah dikering-anginkan selama 3 hari, dirajang kecil lalu direndam dengan 200 mL etanol selama 24 jam, disaring, diulang hingga 3 kali. Ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental. Pada ekstraksi dekok 100 gram simplisia ditambahkan 200 mL akuades, dipanaskan hingga volume pelarut susut setengahnya, disaring (diulang hingga 3 kali), lalu dipekatkan di atas penangas sehingga

didapatkan ekstrak kering (Li *et al.*, 2007) Total ekstrak yang didapatkan adalah 13 ekstrak etanol dan 13 ekstrak air yang akan digunakan untuk uji aktivitas antimalaria.

Uji Aktivitas Antimalaria

Fraksi yang diperoleh dibuat konsentrasi 1000 ppm sebanyak 20 μ L lalu dicampur dengan Tween 20 22,2 ppm 90 μ L dan larutan 111,1 μ M hemin klorida dalam *buffer* asetat pH 4,8 sebanyak 90 μ L dalam *microplate* 96 sumuran. Lalu diinkubasi dalam inkubator selama 3 jam pada suhu 37°C, selanjutnya diukur dengan Elisa Reader pada panjang gelombang 405 dan 620 nm. (Modifikasi metode (Huy *et al.*, 2007)).

$$f = \frac{A(kontrol) - A(sampel)}{A(kontrol) - A(min)}$$

$$\% \text{ hambatan} = (1 - f) \times 100 \%$$

Keterangan:

- f : fraksi perubahan hemin klorida menjadi β -hematin
A(kontrol) : Absorbansi hemin klorida
A(sampel) : Absorbansi sampel setelah ditambahkan ke dalam hemin klorida dan Tween 20
A(min) : Absorbansi hemin klorida dan Tween 20

Skrining fitokimia ekstrak dengan aktivitas antimalaria paling tinggi

Ekstrak dengan aktivitas antimalaria paling tinggi dilakukan skrining fitokimia secara kualitatif dengan metode Harborne (1998). Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan NH_4OH 25% dan kloroform ke dalam sampel. Filtrat berupa larutan organik diekstraksi HCl pekat. Lapisan asam ditambahkan beberapa tetes pereaksi *Dragendorff*. Terbentuknya endapan merah bata menunjukkan adanya alkaloid.

Uji steroid atau triterpenoid dilakukan dengan memaserasi 1 gram sampel dalam 20 mL eter selama dua jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga kering ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial dan satu tetes asam sulfat pekat pada residu (1 tetes setara 0,067 mL). Terbentuknya warna hijau ungu dan biru menunjukkan adanya kandungan steroid atau triterpenoid.

Uji kumarin dilakukan dengan menambahkan 10 mL eter pada 2 gram sampel, disaring dan filtrat diuapkan. Setelah filtrat kering, ditambahkan 10 mL air panas dan didinginkan, lalu ditambahkan 0,5 mL larutan amoniak 10%. Adanya fluoresensi hijau atau biru pada sinar UV menunjukkan adanya kumarin.

Pada uji flavonoid, saponin, tanin dan kuinon, sebanyak 2 gram sampel dididihkan dalam air panas selama lima menit, dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol kemudian dikocok dengan kuat dan larutan dibiarkan memisah sesuai dengan pelarutnya. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan alkohol. Tabung kedua dikocok dengan kuat secara vertikal. Larutan didiamkan selama 10 menit sampai terbentuk busa. Busa yang terbentuk dan tidak hilang

setelah penambahan HCl 2 N menunjukkan adanya kandungan saponin. Tabung ketiga ditambahkan 1 tetes larutan FeCl₃ 1%. Warna biru yang dihasilkan menunjukkan adanya kandungan tanin. Tabung keempat ditambahkan dengan 1 tetes NaOH 1 N dan warna merah yang terbentuk menunjukkan adanya kuinon.

Nilai IC₅₀ ekstrak dengan aktivitas antimalaria paling tinggi

Nilai IC₅₀ dicari dengan membuat variasi akhir konsentrasi ekstrak dalam larutan heme: 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Diinkubasi selama 3 jam lalu diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas antimalaria yang dilakukan terhadap 13 ekstrak air dan ekstrak etanol dari 13 jenis tanaman. Nilai persen hambatan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Persen hambatan pembentukan β -hematin ekstrak air dan ekstrak etanol

No	Tanaman	Ekstrak air	Ekstrak etanol
1	Salam koja (<i>Murraya koenigii</i>)	1,11	2,29
2	Mimba (<i>Azadirachta indica</i>)	4,67	2,17
3	Pule (<i>Alstonia scholaris</i>)	8,56	9,75
4	Buah makassar (<i>Brucea javanica</i>)	16,16	7,29
5	Jung Rahap (<i>Baeckea frutescens</i>)	58,48	12,04
6	Murbei (<i>Morus alba</i>)	8,56	18,54
7	Bidara (<i>Ziziphus mauritiana</i>)	4,44	19,49
8	Tabat Barito (<i>Ficus deltoidea</i> jack)	32,88	13,71
9	Ceplikan (<i>Solidago virgaurea</i>)	50,08	25,44
10	Srigunggu (<i>Clerodendron serratum</i> [L.] Sp r)	18,46	12,99
11	Rumput Mutiara (<i>Hedyotis corymbosa</i>)	23,45	8,64
12	Bawang dayak (<i>Eleutherine palmifolia</i>)	10,38	18,46
13	Akar kuning (<i>Arcangelisia flava</i>)	37,88	19,81

Berdasarkan tabel 1 diatas nilai hambatan pembentukan β -hematin paling tinggi yang artinya memiliki aktivitas antimalaria paling tinggi yaitu ekstrak air daun jung rahab sebesar 58,48%. Ekstrak air daun jung rahab yang selanjutnya akan diuji nilai IC₅₀ dan skrining fitokimia.

Ekstrak air daun jung rahab telah diteliti memiliki aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* dan antibabesial terhadap parasit *Babesia gibsoni* (Murnigsih *et al.*, 2005). Aktivitas antimalaria berdasarkan penghambatan β -hematin mengkonfirmasi kemungkinan mekanisme menghambat pertumbuhan parasit dengan cara menghambat pembentukan hemozoin.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ ekstrak air daun jung rahab (*Baeckea frutecens* L.)

Zat uji	Konsentrasi (ppm)	% hambat	IC ₅₀
Ekstrak air daun jung rahab	10	9,2	51,50 ppm
	20	17,4	
	30	34,9	
	40	43,1	
	50	43,8	

Nilai IC₅₀ ekstrak air dan jung rahab berdasarkan hubungan antara konsentrasi ekstrak dan persen hambatan didapat sebesar 51,50 ppm. Dari tabel konsentrasi ekstrak air daun jung rahab menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi juga nilai persen hambatnya, yang artinya aktivitas antimalaria-nya juga semakin baik.

Skrining fitokimia ekstrak air daun jung rahab (*Baekkea frutezens L.*)

Skrining fitokimia untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak air daun jung rahab. Hasil skrining fitokimia pada ekstrak air daun jung rahab terdapat golongan flavonoid, saponin dan tanin (dapat dilihat pada tabel 3).

Tabel 3. Skrining fitokimia ekstrak air daun jung rahab

No	Senyawa	Ekstrak air daun jung rahab
1.	Alkaloid	-
2.	Flavonoid	+
3.	Stereoid/triterpenoid	-
4.	Tanin	+
5.	Kuinon	-
6.	Kumarin	-
7.	Saponin	+

Keterangan: tanda (+) mengandung senyawa target, (-) tidak mengandung senyawa target

Skrining fitokimia bertujuan untuk menganalisis tumbuhan untuk mengetahui kandungan senyawa yang memiliki aktivitas biologis (Mustarichie *et al.*, 2011). Hasil skrining ekstrak air daun jung rahab, yaitu flavonoid, saponin dan tanin. Jenis pelarut air yang bersifat polar akan mempengaruhi metabolit sekunder yang ditariknya. Flavonoid diketahui memiliki banyak aktivitas biologis, yaitu untuk mencegah pertumbuhan tumor dan untuk melindungi infeksi saluran pencernaan (Cathrine dan Nagarajan, 2011). Flavonoid hasil ekstraksi teh antimalaria telah dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria yang bekerja secara sinergis (Ferreira *et al.*, 2010). Triterpenoid yang diisolasi dari daun *Morinda lucida* yaitu asam ursolat dan oleanolat yang memiliki aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* yang resisten klorokuin (Cimanga *et al.*, 2006). Tanin dari tanaman *Punica granatum L.* diantaranya yaitu asam galagat dan punicalagin memiliki aktivitas antiplasmodium terhadap *Plasmodium falciparum* (Reddy *et al.*, 2007). Perlu dilakukan pemisahan kimia melalui kromatografi kolom untuk mengetahui senyawa kimia yang berperan sebagai antimalaria. Senyawa yang berhasil diisolasi dari jung rahab adalah floroglusinol, humulin, kariofilen dan kloven (Nisa *et al.*, 2016; Tsui

dan Brown, 1996). Kariofilen yang diisolasi dari *Muraya koenigii* memiliki aktivitas sebagai antiplasmodial. (Kamaraj *et al.*, 2014).

Pada penelitian sebelumnya daun tanaman jung rahab memiliki khasiat sebagai analgesik, antispasmodik, tonik, diuretik, pencahar dan pengobatan pasca-persalinan (Soedibyo *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Ekstrak air daun jung rahab memiliki aktivitas penghambatan β -hematin paling tinggi dibandingkan ekstrak tanaman lainnya yaitu 58,48 % dan nilai IC_{50} sebesar 51,50 ppm. Hasil skrining ekstrak air fitokimia pada ekstrak air daun jung rahab menunjukkan kandungan flavonoid, saponin dan tanin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abatan, M. O., & Makinde, M. J. 1986. Screening *Azadirachta indica* and *Pisum sativum* for possible antimalarial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 17(1), pp. 85–93.
- Adam, Z., Khamis, S., Ismail, A., & Hamid, M. 2012. *Ficus deltoidea*: A potential alternative medicine for diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Agysha, N. V., & others. 2018. *Pengaruh Ekstrak Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia (L), Merr) terhadap Jumlah Limfosit pada Mencit BALB/C yang Diinfeksi Salmonella typhimurium*. Unimus.
- Ariantari, N. P., Vanadis, P. A., Widyadana, K. G. Y., Tumewu, L., & Widyawaruyanti, A. 2012. *In Vitro Antimalarial Activity of Methanolic Extract of Morus Alba L. Leaves against Plasmodium Falciparum 3D7*.
- Cathrine, L., & Nagarajan, N. P. 2011. Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of leaf extracts of *Vitex leucoxydon* LF. *Int J Curr Pharm Res*, 3, pp. 71–73.
- Cimanga, R. K., Tona, G. L., Mesia, G. K., Kambu, O. K., Bakana, D. P., & Kalenda, P. D. T. 2006. Bioassay-guided isolation of antimalarial triterpenoid acids from the leaves of *Morinda lucida*. *Pharmaceutical Biology*, 44(9), pp. 677–681.
- Dewi, K. K. 2014. *Pengaruh Ekstrak Rimpang Kunyit (Curcuma domestica Val) Metode Maserasi dan Dekok terhadap Penurunan Suhu Tubuh Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diberi Vaksin DPT*. *Coping: Community of Publishing in Nursing*, 2(3).

- Egan, T. J., & Ncokazi, K. K. 2005. Quinoline antimalarials decrease the rate of β -hematin formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(7), pp. 1532–1539.
- Ferreira, J. F. S., Luthria, D. L., Sasaki, T., & Heyerick, A. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 15(5), pp. 3135–3170.
- Gandhi, M., & Vinayak, V. K. 1990. Preliminary evaluation of extracts of *Alstonia scholaris* bark for in vivo antimalarial activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 29(1), pp. 51–57.
- Huy, N. T., Uyen, D. T., Maeda, A., Trang, D. T. X., Oida, T., Harada, S., & Kamei, K. 2007. Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for high-throughput screening of antimalarial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), pp. 350–353. <https://doi.org/10.1128/AAC.00985-06>
- Kamaraj, C., Rahuman, A. A., Roopan, S. M., Bagavan, A., Elango, G., Zahir, A. A., & Kirthi, A. V. 2014. Bioassay-guided isolation and characterization of active antiplasmodial compounds from *Murraya koenigii* extracts against *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. *Parasitology Research*, 113(5), pp. 1657–1672. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3810-3>
- Li, H. Bin, Jiang, Y., Wong, C. C., Cheng, K. W., & Chen, F. 2007. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(2), pp. 483–488. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1235-x>
- Lovin, E. R., Arwati, H., & Ramadhani, R. B. 2012. In vitro intraerythrocytic antimalarial activity of akar kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.) stem aqueous extract in *Plasmodium falciparum*. *Folia Medica Indonesiana*, 48(3), p. 90.
- Mishra, K., Dash, A. P., Swain, B. K., & Dey, N. 2009. Anti-malarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extracts and their combination with curcumin. *Malaria Journal*, 8(1), p. 26.
- Murnigsih, T., Matsuura, H., Takahashi, K., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y. 2005. Evaluation of the inhibitory activities of the extracts of Indonesian traditional medicinal plants against *Plasmodium falciparum* and *Babesia gibsoni*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(8), pp. 829–831.
- Nhien, N. T. T., Huy, N. T., Uyen, D. T., Deharo, E., Hoa, P. T. Le, Hirayama, K., & Kamei, K. 2011. Effect of Inducers, Incubation Time and Heme Concentration on IC₅₀ Value Variation in Anti-heme Crystallization Assay. *Tropical Medicine and Health*, 39(4), pp. 119–126. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-29>
- Nisa, K., Ito, T., Kodama, T., Tanaka, M., Okamoto, Y., Asakawa, Y., & Morita, H. 2016. New cytotoxic phloroglucinols, baecenones D-F, from the leaves of Indonesian

- Baeckea frutescens. *Fitoterapia*, 109, pp. 236–240.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.013>
- O'Neill, M. J., Bray, D. H., Boardman, P., Chan, K. L., Phillipson, J. D., Warhurst, D. C., & Peters, W. 1987. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 4: Activity of Brucea javanica fruits against chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in vitro and against Plasmodium berghei in vivo. *Journal of Natural Products*, 50(1), pp. 41–48.
- Panseeta, P., Lomchoey, K., Prabpai, S., Kongsaree, P., Suksamrarn, A., Ruchirawat, S., & Suksamrarn, S. 2011. Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of Ziziphus mauritiana. *Phytochemistry*, 72(9), pp. 909–915.
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from Punica granatum L. *Planta Medica*, 53(05), pp. 461–467.
- Rush, M. A., Baniecki, M. L., Mazitschek, R., Cortese, J. F., Wiegand, R., Clardy, J., & Wirth, D. F. 2009. Colorimetric high-throughput screen for detection of heme crystallization inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp. 2564–2568. <https://doi.org/10.1128/AAC.01466-08>
- Soedibyo, M., & others. 1998. *Alam sumber kesehatan*. Balai Pustaka.
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), pp. 1–4.
- Tsui, W.-Y., & Brown, G. D. 1996. Sesquiterpenes from Baeckea frutescens. *Journal of Natural Products*, 59(11), pp. 1084–1086.