

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang masih menjadi masalah kesehatan dunia dan ditemukan di negara-negara yang beriklim tropis. Pada tahun 2015, kasus malaria di dunia diperkirakan mencapai 214 juta, sebagian besar terjadi di Afrika (88%), diikuti wilayah Asia Tenggara (10%) dan wilayah timur Mediterania (2%). Malaria juga telah menyebabkan kematian pada 438.000 jiwa, 306.000 diantaranya merupakan anak-anak usia kurang dari 5 tahun⁽¹⁾.

Indonesia merupakan salah satu negara tropis dan berada di kawasan Asia Tenggara, yang masuk dalam kategori resiko penularan tinggi malaria. Menurut laporan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) angka API (*Annual Parasite Incidence*) secara nasional pada tahun 2015 adalah 0,85. Akan tetapi terdapat beberapa daerah yang memiliki angka API jauh diatas angka API nasional, seperti Papua (31,93), Papua Barat (31,29), NTT (7,04), Maluku (5,81), Maluku utara (2,77), Bengkulu (2,03), Kep. Bangka Belitung (1,08), dan Sulawesi Utara (0,88)⁽²⁾.

Program pemberantasan malaria masih menjadi prioritas bagi WHO mengingat tingkat infeksi dan kematian diakibatkan oleh malaria masih tergolong tinggi. Berbagai usaha pemerintah untuk menangani penyakit malaria ini diantaranya penggunaan insektisida, pemberian vaksin dan pengobatan dengan menggunakan obat antimalaria. Akan tetapi terdapat beberapa permasalahan yang menghambat pemberantasan malaria tersebut di antaranya, resistensi vektor terhadap insektisida⁽³⁾⁽⁴⁾, kesulitan pembuatan vaksin⁽⁵⁾, dan resistensi obat antimalaria⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

Beberapa *Plasmodium* diketahui telah mengalami resisten terhadap antimalaria diantaranya, klorokuin, primaquin, sulfadoksin + pirimetamin, amodiakuin, artemisinin, meflokuin⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Dengan kejadian ini, ketersediaan obat antimalaria semakin berkurang, oleh karena itu penemuan obat-obat baru sangat diperlukan.

Berdasarkan cara kerjanya, obat antimalaria yang beredar saat ini terbagi menjadi 6 golongan yaitu, golongan kuinin (klorokuin, meflokuin, amodiakuin), golongan penghambat pembentukan asam folat (sulfadoxin, pyrimetamin), golongan antibiotik (tetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol), golongan artemisinin (artemisinin, artemether, artesunat), Golongan Miscellaneous (atovaquon, lumefantrin, halofantrin), golongan ACT (*Artemisinin Combination Therapy*) dan non ACT ⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

Salah satu golongan antimalaria yang masih menjadi target pengobatan untuk dikembangkan yaitu golongan obat yang bekerja dengan menghambat pembentukan hem. Target pengobatan golongan ini masih potensial untuk dikembangkan, karena dengan menghambat pembentukan hem mengakibatkan perkembangan *Plasmodium* terhenti. Penghambatan polimerisasi hem akan mempengaruhi metabolisme seluler yaitu menghambat enzim, peroksida membran dan produksi radikal bebas, dengan demikian *Plasmodium* akan kekurangan nutrisi dan mengalami ketoksikan hingga akhirnya mengalami kematian⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾. Obat antimalaria golongan ini merupakan obat pilihan pertama dan digunakan luas oleh masyarakat untuk mengobati malaria. Akan tetapi, telah ditemukan beberapa penelitian yang menyatakan bahwa telah terjadinya resistensi *Plasmodium* terhadap obat golongan ini, sehingga pengembangan dan penemuan obat baru yang terkait mekanisme penghambatan polimerisasi hem penting dilakukan.

Hingga saat ini selain menggunakan obat-obat modern, masyarakat Indonesia juga menggunakan sumber daya alam (mineral, tanaman, hewani) untuk mengatasi penyakit malaria. Hal ini dilakukan karena bahan mudah didapatkan, lebih ekonomis, tidak membutuhkan keahlian khusus dalam mengolahnya dan terbukti berkhasiat secara empiris. Dari informasi empiris tersebut, para peneliti kemudian melakukan pembuktian untuk mengetahui kebenarannya. Beberapa bahan alam yang telah terbukti mempunyai aktivitas sebagai antimalaria misalnya biji nimba ⁽¹⁴⁾, daun kembang bulan ⁽¹⁵⁾, herba bandotan ⁽¹⁶⁾, kayu tanaman akar kuning ⁽¹⁷⁾, daun cincau rambat ⁽¹⁸⁾, dan spons ⁽¹⁹⁾.

Di daerah Bengkulu, salah satu sumber daya alam yang digunakan masyarakat untuk mengobati malaria adalah undur-undur (*Myrmeleon sp*), yang dikenal dengan nama lain pucung ataupun ucung. Masyarakat menggunakan undur-undur dengan cara menelan 5-7 ekor, baik dalam keadaan hidup ataupun yang telah disangrai terlebih dahulu. Undur-undur (*Myrmeleon sp*) tersebar hampir di seluruh belahan dunia, terutama di daerah yang berpasir kering⁽²⁰⁾. Di daerah Bengkulu, ketersediaan undur-undur sangat melimpah, khususnya di daerah pedesaan karena masih banyak rumah-rumah panggung yang di bawahnya berupa tanah kering dan berdebu. Hasil penelitian sebelumnya, menyatakan bahwa undur-undur (*Myrmeleon sp*) memiliki efek menurunkan gula darah⁽²¹⁾⁽²²⁾, menurunkan kadar trigliserida⁽²³⁾, bahkan sebagai hepatoprotektor⁽²⁴⁾. Akan tetapi, belum ditemukan bukti ilmiah yang mengatakan bahwa undur-undur (*Myrmeleon sp*) dapat digunakan sebagai antimalaria. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria yang terdapat pada undur-undur berdasarkan keyakinan masyarakat dengan menggunakan metode uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem.

Pada umumnya penggunaan bahan hewani sebagai terapi melibatkan metabolit primer (lemak, protein, glukosa) sebagai senyawa yang berkhasiat. Senyawa yang paling banyak ditemukan mempunyai aktivitas terapi berasal dari golongan protein, khususnya peptida. Peptida merupakan senyawa pembentuk protein yang tersusun atas beberapa asam amino yang saling berikatan, dapat berupa rantai pendek maupun rantai panjang. Pada beberapa penelitian, ditemukan jenis peptida rantai pendek yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾, antiparasit⁽²⁷⁾, dan antioksidan⁽²⁸⁾. Suatu penelitian menyatakan bahwa, dengan menyuntikkan peptida *Cecropins* dan *Magainin* setelah ke dalam tubuh nyamuk yang terinfeksi *Plasmodium* terbukti menghambat pembentukan sporozoit sehingga nyamuk tidak bisa menularkan *Plasmodium* tersebut ke host yang lainnya. Berdasarkan hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa senyawa peptida berpotensi untuk dikembangkan menjadi pengobatan antimalaria, sehingga identifikasi peptida perlu dilakukan.

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa peptida yang terdapat pada undur-undur adalah metode biuret. Metode ini umumnya digunakan untuk menganalisis kandungan protein, dengan mereaksikan CuSO_4 dalam suasana basa terhadap bahan uji yang diduga mengandung protein. Hasil dari reaksi tersebut akan menimbulkan warna ungu yaitu hasil ikatan kovalen antara ion Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang terdapat pada bahan uji tersebut. Sehingga secara kualitatif metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa peptida pada bahan uji.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat diambil rumusan masalah, yaitu :

1. Bagaimana aktivitas penghambatan polimerisasi hem pada ekstrak undur-undur (*Myrmeleon sp*)?
2. Apakah terdapat senyawa peptida yang terkandung di dalam ekstrak undur-undur (*Myrmeleon sp*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Mengetahui aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari ekstrak undur-undur (*Myrmeleon sp*).
2. Mengidentifikasi senyawa peptida yang terkandung di dalam ekstrak undur-undur (*Myrmeleon sp*).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Manfaat bagi ilmu pengetahuan
Dapat menjadi acuan dalam pengembangan obat baru antimalaria, dan dapat menjadi pedoman dalam melakukan pengembangan potensi khasiat undur-undur (*Myrmeleon sp*).
2. Manfaat bagi masyarakat
Menambah keyakinan masyarakat dalam menggunakan undur-undur sebagai terapi yang tepat untuk penyakit malaria.

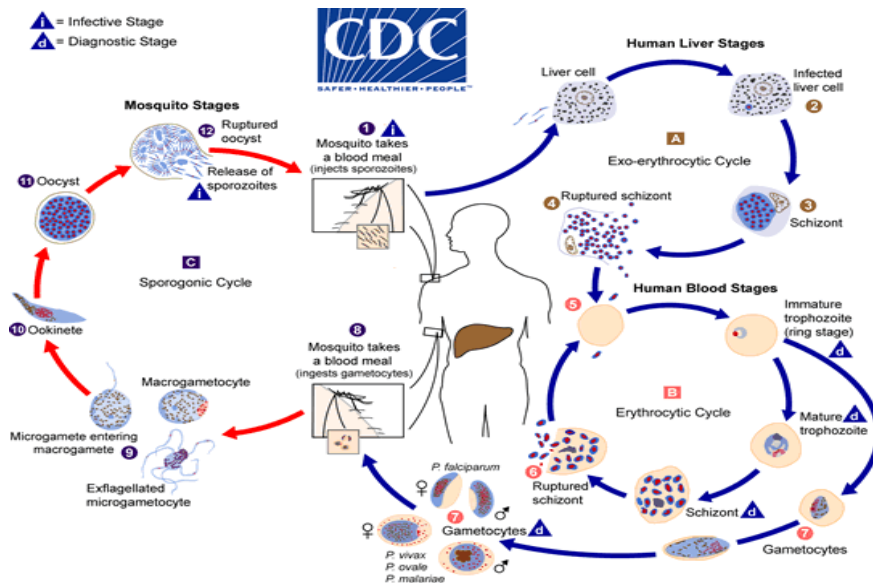
3. Manfaat bagi institusi

Dapat menambah daftar literatur dalam upaya meneruskan penelitian antimalaria dan potensi pemanfaatan undur-undur (*Myrmeleon sp*).

BAB II
STUDI PUSTAKA
2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 Malaria

Malaria disebabkan oleh parasit *Plasmodium sp* yang menginfeksi tubuh inangnya dengan perantara gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Gejala yang ditimbulkan oleh penyakit malaria yaitu demam, menggigil, berkeringat, sakit kepala, lemas, dan gejala lainnya yang hampir sama dengan gejala infeksi virus. Kemudian dapat berkembang menjadi menurunnya tingkat kesadaran, anemia berat, gagal ginjal, hingga kegagalan organ lainnya⁽²⁹⁾. Terdapat 5 jenis spesies *Plasmodium* yang bisa menginfeksi manusia yaitu, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium Knowlesi*⁽¹¹⁾⁽³⁰⁾.



Gambar 1. Siklus hidup *Plasmodium Sp*⁽³¹⁾⁽³²⁾

Plasmodium memiliki dua siklus kehidupan, siklus seksual terjadi pada tubuh nyamuk dan siklus aseksual terjadi tubuh manusia. Siklus seksual *Plasmodium* terjadi ketika nyamuk *Anopheles* betina terinfeksi setelah menggigit manusia yang terdapat gametosit di dalam darahnya. Bentuk tersebut kemudian berubah menjadi mikrogametosit dan makrogametosit sehingga terjadilah

pembuahan zigot (*ookinete*). *Ookinete* dapat menembus dinding lambung nyamuk dan berubah menjadi *oocyst*. Ketika *oocyst* pecah, ribuan *sporozoite* akan dilepaskan dan bermigrasi menuju kelenjar ludah nyamuk, kemudian akan ditransmisi kepada manusia lainnya ketika digigit oleh nyamuk yang terinfeksi ini. Nyamuk *Anopheles* yang terinfeksi ini akan bersifat infeksiif sepanjang hidupnya⁽²⁹⁾⁽³³⁾⁽³¹⁾.

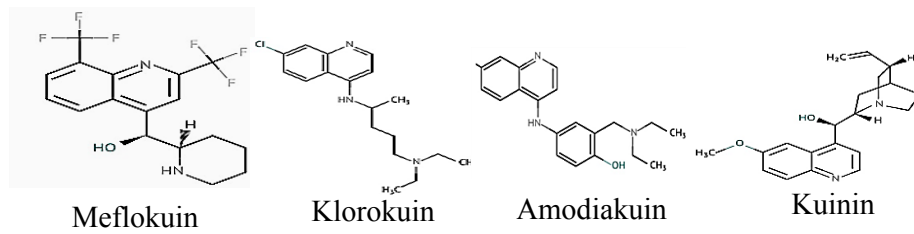
Siklus hidup aseksual *Plasmodium* terjadi ketika nyamuk yang telah terinfeksi menggigit manusia, *sporozoite* akan masuk ke dalam darah manusia melalui ludahnya. *Sporozoite* berpindah ke hati dan menembus hepatosit. Tahap dorman bagi *sporozoite Plasmodium* dalam hati dikenal sebagai *hipnozoite*. Dari hepatosit, parasit berkembang biak menjadi ribuan *merozoite*, yang kemudian menyerang sel darah merah. Kemudian parasit membesar dari bentuk cincin ke bentuk *trophozoite* dewasa. Pada tahap *schizont*, parasit membelah beberapa kali untuk membentuk *merozoite* baru, yang meninggalkan sel darah merah dan bergerak melalui saluran darah untuk menembus sel darah merah baru. Beberapa *merozoite* mengulangi siklus ini secara terus-menerus, dan sebagian *merozoite* berubah menjadi bentuk jantan atau betina (gametosit) yang kemudian dapat dihisap oleh nyamuk betina dan dapat menulari manusia lainnya⁽²⁹⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾.

2.1.2 Obat Antimalaria

Berdasarkan mekanisme kerjanya obat antimalaria dapat digolongkan menjadi⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾:

1. Golongan *Quinine*

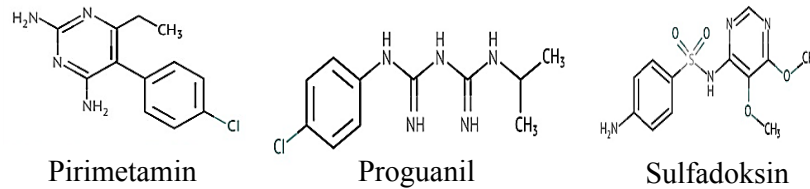
Cara kerja golongan *quinine* yaitu menghambat polimerisasi hem dengan cara membentuk kompleks FP IX (*Ferryprotoporphyrin*) dalam vakuola. Zat tersebut sangat toksik bagi *Plasmodium* dan bekerja dengan menghambat ambilan makanan sehingga membuat parasit mengalami kekurangan nutrisi dan akhirnya mati. Contoh obat dari golongan ini yaitu kuinin, klorokuin, amodiakuin, dan meflokuin⁽³⁸⁾.



Gambar 2. Struktur kimia obat golongan *Quinine*⁽¹²⁾

2. Golongan Antifolat

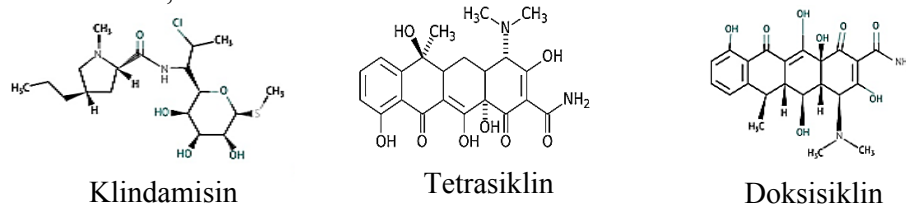
Golongan obat ini bekerja dengan menghambat sintesis asam folat yang berperan dalam pembentukan DNA sel parasit. Ketika sintesis asam folat terhambat, aktivitas pertumbuhan sel *Plasmodium* akan terhambat dan secara bertahap akan mengalami kematian. Obat yang termasuk ke dalam golongan ini yaitu sulfadoksin, proguanil dan pirimetamin⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾.



Gambar 3. Struktur kimia obat golongan antifolat⁽¹²⁾

3. Golongan Antibiotik

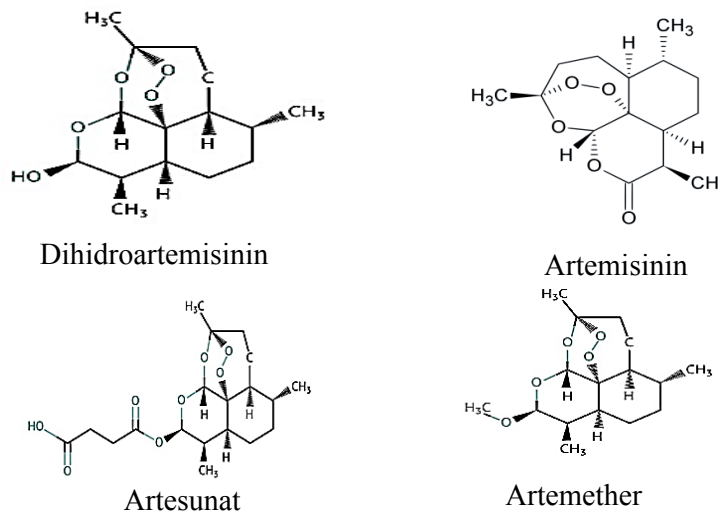
Golongan antibiotik yang dimaksud yaitu antibiotik yang mempunyai mekanisme menghambat pembentukan protein, berikatan dengan ribosom 70S dari mitokondria parasit sehingga *Plasmodium* tidak dapat menghasilkan proteinnya sendiri dan akhirnya dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium*. Contoh obat antimalaria golongan ini yaitu tetrasiklin, doksisisiklin dan klindamisin⁽⁴¹⁾.



Gambar 4. Struktur kimia obat golongan antibiotik⁽¹²⁾

4. Golongan Artemisinin

Mekanisme kerja golongan artemisinin yaitu berinteraksi dengan *Ferriprotoporphyrin IX* di dalam vakuola makanan parasit yang bersifat asam dengan menghasilkan spesies radikal bebas yang bersifat toksik. Struktur jembatan peroksida pada molekul artemisinin dapat diputus oleh ion ferro yang berasal dari hemoglobin, menjadi radikal bebas yang sangat reaktif sehingga membunuh parasit. Contoh obat dari golongan ini yaitu artesunat, artemisinin, dihidroartemisinin dan artemether ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾⁽³⁷⁾.



Gambar 5. Struktur kimia obat golongan artemisinin⁽¹²⁾

5. Golongan *Miscellaneous*

Obat yang termasuk ke dalam golongan ini diantaranya lumefantrin, halofantrin, dan atovaquon. Lumefantrin bekerja sama dengan golongan artemisinin mencegah detoksifikasi hem dalam parasit vakuola makanan, sehingga menyebabkan akumulasi kompleks hem yang toksik. Halofantrin bekerja dengan membentuk kompleks dengan FP IX, halofantrin efektif dalam mengatasi multi resisten obat antimalaria, akan tetapi efek samping berupa gagal jantung menjadikan pemakaian halofantrin ini harus diwaspadai ⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. Atovaquon bekerja dengan menghambat rantai transport elektron pada mitokondria, sehingga mengakibatkan fungsi mitokondria menjadi rusak. Peranan mitokondria adalah membantu dalam biosintesis purin ⁽⁴⁶⁾.



Gambar 6. Struktur kimia obat golongan *miscellaneous*⁽¹²⁾

6. Golongan ACT dan non ACT

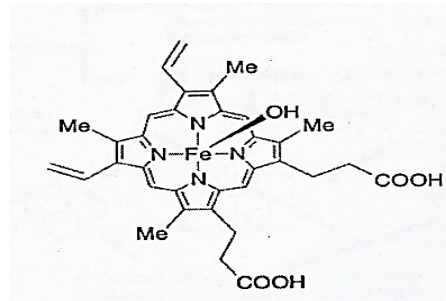
Beberapa penelitian telah menemukan banyaknya obat antimalaria yang telah resisten terhadap *Plasmodium sp* sehingga WHO menganjurkan pengobatan dengan kombinasi ACT (*Artemisinin Combination Therapy*) dan non ACT sebagai berikut ⁽⁴¹⁾⁽⁹⁾:

Tabel 1. Antimalaria golongan ACT dan non ACT⁽⁹⁾

Golongan	Kombinasi Obat
ACT	Arthemeter + lumefantrin
	Dihydroartemisinin + piperakuin + primakuin
	Artesunat + amodiakuin + primakuin
	Artesunat + sulfadoksin + pirimetamin
	Artesunat + meflokuin
Non ACT	Kina + doksisisiklin + primakuin
	Kina + doksisisiklin/tetrasiklin
	Kina + primakuin
	Amodiakuin + sulfadoksin + pirimetamin

2.1.3 Penghambatan Polimerisasi Hem

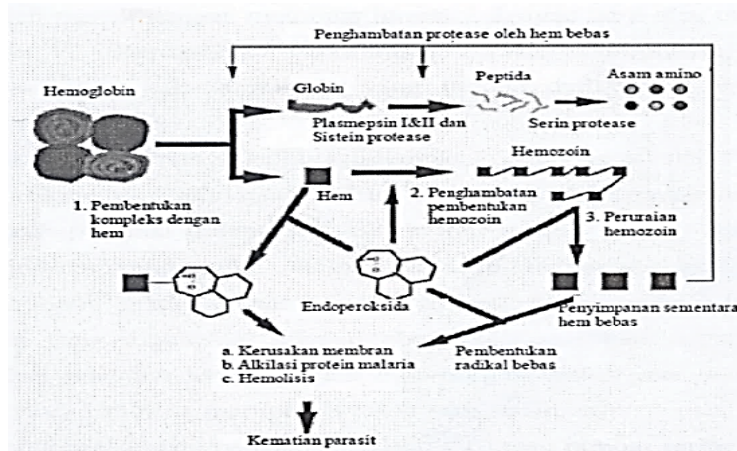
Salah satu mekanisme obat yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria yaitu penghambatan pembentukan hem menjadi hemozoin. *Plasmodium* akan melakukan degradasi hemoglobin eritrosit dan diubah menjadi asam amino dan hem. Asam amino yang dihasilkan akan digunakan *Plasmodium* sebagai suplay makanan, sedangkan hem yang bersifat toksik bagi plasmodium akan diubah menjadi hemozoin dan disimpan didalam vakuola. Hemozoin yang diubah akan dilepaskan dalam darah pada saat plasmodium mengalami pembelahan menjadi *merozoite* dan *schizont*. Penghambatan polimerisasi hem menjadi hemozoin ini yang digunakan sebagai skrining awal sebagai uji aktifitas antiplasmodium ⁽⁴⁷⁾.



Gambar 7. Struktur Kimia Hematin ⁽⁴⁸⁾

Hemoglobin merupakan protein utama yang berada di dalam eritrosit yang digunakan sebagai suplay nutrisi oleh parasit malaria. Plasmodium mendegradasi hemoglobin dan menggunakan turunan asam amino dari digesti proteolitik untuk menunjang biosintesisnya. Hemoglobin ini dipecah menjadi globin dengan bantuan enzim protease globin akan diubah menjadi peptida. Peptida-peptida akan ditransport dari vakuola digestif ke sitoplasma yang nantinya akan dipecah menjadi asam amino dengan bantuan serine protease ⁽⁴⁸⁾.

Hem bebas toksik dalam jumlah besar merupakan akibat dari degradasi hemoglobin. Saat hemoglobin dipecah hem masih dalam bentuk ferodan sifatnya tidak toksik. Ketika hemoglobin dipecah menjadi hem bentuk tersebut berubah menjadi feri yang sifatnya sangat toksik, menghambat vakuola protease dan membran parasit. Hem bebas bersifat sangat toksik bagi parasit dan mempengaruhi metabolisme seluler dengan menghambat enzim, peroksida membran dan produksi radikal bebas. Detoksifikasi hem tentu sangat dibutuhkan agar tidak mengganggu pertumbuhan dan proliferasi dari parasit. Detoksifikasi berlangsung cepat dengan melakukan polimerisasi menjadi kristal hemozoin yang tidak toksik bagi parasit. Dalam vakuola makanan hem diubah menjadi hemozoin atau yang disebut dengan pigmen malaria. Pigmen malaria ini adalah polimer dari unit-unit hem yang berikatan antara besi dan karmoksilatnya. Bentuk ikatan ini mengikat pada ion besi sentral pada satu unit hem (Ferri) dengan sisi rantai propionat dari hem yang lain ⁽⁴⁸⁾.



Gambar 8. Penghambatan polimerisasi hem ⁽⁴⁸⁾

2.1.4 Undur-undur (*Myrmeleon Sp*)

Undur-undur (*Myrmeleon Sp*) adalah kelompok binatang holometabolayang mengalami metamorfosis sempurna.Tahapan dari daur serangga yang mengalami metamorfosis sempurna adalah telur, larva, pupa, lalu menjadi imago. Larva adalah hewan muda yang bentuk dan sifatnya berbeda dengan hewan dewasa, ciri-cirinya yaitu kepala mempunyai capit, berkaki 6 (enam), badan berbulu halus, berjalan mundur, dengan ukuran 1-2,5 cm. Pupa adalah kepompong dimana pada tahap ini serangga tidak melakukan kegiatan, akan tetapi terjadi penyempurnaan dan pembentukan organ. Selanjutnya akan menjadi imago yaitu fase dewasa atau fase perkembangbiakan. Undur-undur dewasa memiliki dua pasang sayap yang panjang, kecil, serta terdapat banyak pembuluh, dengan pembuluh darah apikal masuk ke dalam ruang yang membujur, serta abdomen yang langsing ⁽⁴⁹⁾⁽²⁴⁾. Nama lokal dari undur-undur dewasa ini yaitu capung jarum. Undur-undur bersifat omnivora, yaitu memakan semut atau serangga kecil lainnya, sedangkan undur-undur dewasa memakan serbuk sari bunga. Undur-undur hidup di tanah berpasir dengan membentuk pusaran sebagai jebakan terhadap mangsanya⁽⁴⁹⁾.

Undur-undur (*Myrmeleon sp*) darat diklasifikasikan sebagai berikut⁽²⁰⁾.

Kingdom : *Animal*
 Divisi : *Magnoliophyza*
 Kelas : *Insecta*
 Ordo : *Neuroptera*
 Famili : *Myrmeleontidae*

Genus : *Myrmeleon*
Spesies : *Myrmeleon sp.*



Gambar 9. Undur-undur ⁽²⁴⁾

Kajian potensi undur-undur telah dilakukan secara *invitro* di UGM, menunjukkan bahwa pemberian jus undur-undur dapat menurunkan kadar gula dalam darah ⁽²¹⁾. Penelitian *in vitro* lainnya juga menunjukkan bahwa ekstrak metanol undur-undur dapat menurunkan aktivitas enzim α glukosidase ⁽²²⁾, menurunkan kadar trigliserida ⁽²³⁾, dan sebagai hepatoprotektor ⁽²⁴⁾.

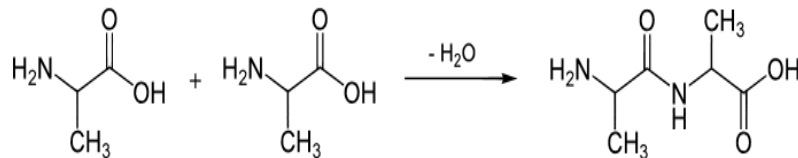
Di daerah Bengkulu secara tradisional undur-undur dimanfaatkan untuk mengobati malaria, yaitu dengan cara menelan 5-7 ekor undur-undur baik yang hidup maupun yang telah dimatikan terlebih dahulu, dengan cara dimasukkan ke dalam kapsul terlebih dahulu maupun ditelan secara langsung.

2.1.5 Peptida

Peptida merupakan suatu senyawa yang terbentuk oleh beberapa molekul asam amino yang saling berikatan. Peptida yang terbentuk tidak lebih dari sepuluh molekul asam amino disebut oligopeptida. Peptida yang terbentuk dari lebih seratus molekul asam amino disebut polipeptida. Polipeptida yang saling berikatan maka dapat membentuk protein.

Senyawa peptida terbentuk ketika atom karbon pada gugus karboksil suatu asam amino yang berbagi elektron dengan atom nitrogen pada gugus amina molekul lain dan melepas molekul air. Keberadaan senyawa peptida mempunyai fungsi yang penting dalam sistem biologi yaitu sebagai koenzim, dan hormon. Dalam ilmu kefarmasian, penemuan obat antibiotik penisilin yang dihasilkan oleh jamur *Penicillium notanum* merupakan suatu peptida. Pada penelitian lain yang dilakukan secara *invitro*, dengan menyuntikan suatu senyawa

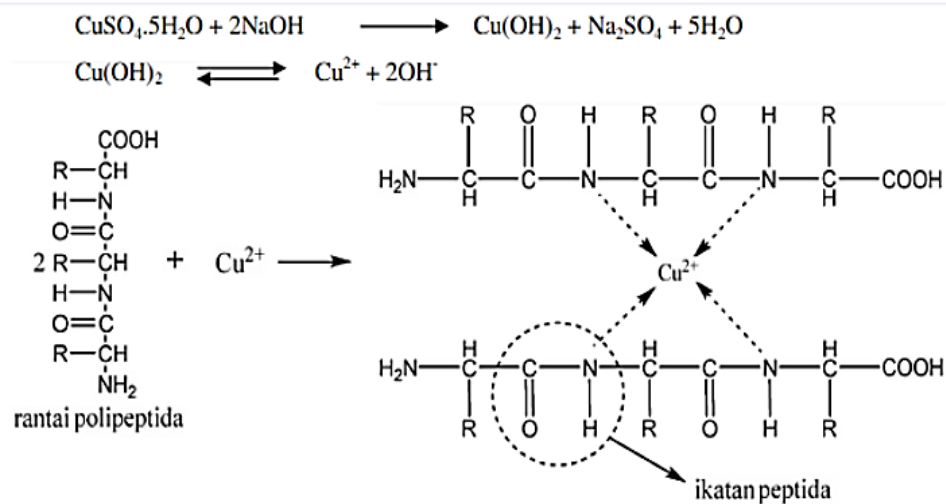
peptida (*magainins* dan *cecropins*) ke nyamuk *Anopheles* yang telah terinfeksi berbagai spesies *plasmodium*, terbukti mengganggu perkembangan sporozoit pada tahap pertumbuhan seksual sehingga vektor tidak dapat mengirimkan parasit ke *host* lain⁽⁵⁰⁾.



Gambar 10. Pembentukan ikatan peptida

2.1.6 Metode Biuret

Metode biuret pada umumnya digunakan untuk mengidentifikasi protein pada suatu bahan. Metode ini prinsipnya adalah pembentukan ikatan kovalen dari ion Cu^{2+} pada senyawa peptida yang terdapat pada bahan tersebut, ikatan tersebut akan menghasilkan perubahan warna menjadi biru hingga ungu. Cara pengujian yang sederhana, ekonomis, dan bahan yang mudah ditemukan menjadi suatu kelebihan dalam memilih metode tersebut. Walaupun umumnya dipakai untuk mengidentifikasi senyawa protein, jika dilihat dari mekanisme reaksinya metode ini dapat pula digunakan untuk mengidentifikasi senyawa peptida.



Gambar 11. Mekanisme Reaksi Metode Biuret

Mekanisme kerja dari metode biuret yaitu larutan uji akan dibuat alkalis (basa) dengan penambahan NaOH, kemudian ditambahkan CuSO₄ untuk memulai reaksi kompleks. Ion Cu²⁺ akan mengikat gugus amida karboksil pada ikatan peptida yang terdapat pada bahan uji secara kovalen, sehingga menimbulkan warna biru hingga ungu. Semakin banyak ikatan peptida yang terdapat di dalamnya, warna yang dihasilkan akan semakin ungu. Kekurangan metode ini yaitu tidak spesifik untuk menggambarkan kadar protein, karena gugus amida tidak hanya terdapat pada protein. Meskipun metode ini tidak spesifik dalam menggambarkan kadar protein, akan tetapi metode ini dapat digunakan secara kualitatif untuk mengidentifikasi senyawa peptida di dalam bahan uji.

2.2 Landasan Teori

Penyakit malaria disebabkan oleh infeksi parasit *Plasmodium sp*, dengan vektor nyamuk *Anopheles* betina. Pemberantasan malaria masih menjadi prioritas bagi WHO, karena tingkat infeksi malaria di dunia masih tinggi, pada tahun 2015 angka infeksi mencapai 214 juta kasus, sebagian besar terjadi di Afrika ⁽¹⁾.

Pemberantasan penyakit malaria telah dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya yaitu dengan mengembangkan pengobatan modern. Akan tetapi, seiring dengan berkembangnya obat-obatan antimalaria, terdapat juga permasalahan-permasalahan lain yang menghambat pemberantasan malaria tersebut, diantaranya resistensi vektor terhadap insektisida, kesulitan produksi vaksin, hingga resistensinya *Plasmodium* terhadap obat antimalaria. Agar pemberantasan malaria dapat berjalan dengan lancar, dibutuhkan solusi dari semua permasalahan tersebut, salah satunya adalah dengan penemuan obat baru.

Salah satu target pengembangan obat antimalaria yang masih potensial yaitu penghambatan polimerisasi hem. Mekanisme golongan obat ini bekerja dengan membentuk kompleks FP IX (*Ferryprotoporphyrin*) dalam vakuola yang sangat toksik bagi *Plasmodium* dan dapat menghambat ambilan makanan sehingga membuat parasit mengalami kekurangan nutrisi dan akhirnya mati ⁽⁴⁸⁾.

Dalam mengatasi penyakit malaria masyarakat Indonesia tidak hanya menggunakan obat modern sebagai alternatif pengobatan, tetapi juga

menggunakan bahan-bahan alam, baik tumbuhan, mineral maupun hewan. Undur-undur (*Myrmeleon sp.*) merupakan salah satu bahan alam yang biasa digunakan oleh masyarakat Bengkulu untuk mengatasi malaria. Penggunaan undur-undur ini tersebar luas di daerah tersebut, tidak hanya sebagai terapi malaria tetapi juga digunakan untuk menurunkan kadar gula darah dan untuk mengatasi sakit tipes.

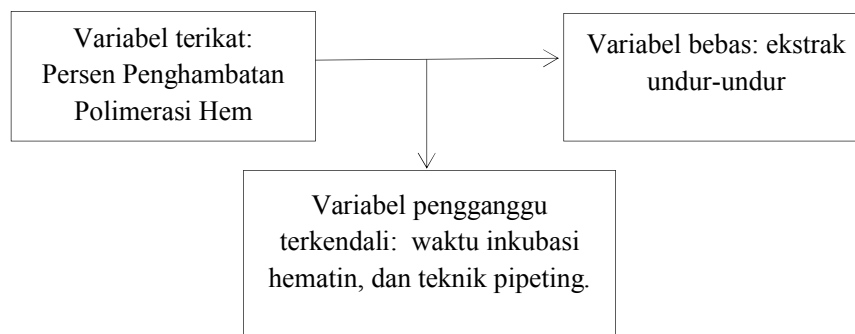
Pada sampel hewani, pada umumnya senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai pengobatan terdapat pada protein. Protein merupakan senyawa yang tersusun atas ikatan-ikatan polipeptida dan berfungsi sebagai bahan pembangun tubuh. Pada beberapa penelitian yang melibatkan sampel hewani, ditemukan bahwa senyawa peptida mempunyai aktivitas sebagai antimalaria⁽⁵⁰⁾, antiparasit⁽⁵¹⁾ dan antioksidan⁽⁵²⁾, sehingga pengujian undur-undur sebagai antimalaria (penghambatan polimerisasi hem) dan identifikasi senyawa peptida perlu dilakukan.

2.3 Hipotesis

1. Ekstrak Undur-undur (*Myrmeleon sp*) mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi hem.
2. Terdapat senyawa peptida yang terkandung pada ekstrak undur-undur.

2.4 Kerangka Konsep Penelitian

Variabel penelitian



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi standar hematin (Sigma), NaOH 0,1 M, akuades, asam asetat glasial pH 2,6, DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Merck), CuSO₄ dan undur-undur (*Myrmeleon sp*).

3.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Mikrokultur 96 sumuran, inkubator CO₂, sentrifugator, ELISA *reader*, mikropipet, tip, seperangkat alat gelas, tabung mikrosentrifus, timbangan, mortir dan stamper.

3.2 Cara Penelitian

3.2.1 Identifikasi Undur-undur

Identifikasi bertujuan untuk memastikan kebenaran sampel yang akan diteliti. Identifikasi dilakukan di laboratorium Entomologi Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

3.2.2 Pengumpulan Undur-undur

Undur-undur (*Myrmeleon sp*) diambil dari pekarangan warga di Desa Mecas, Desa Nganggrung, dan Desa Lodadi yang terletak di sekitar wilayah jalan kaliurang kilometer 12 - 14. Cara mengambilnya yaitu dengan menggunakan lidi sebagai pendorong undur-undur untuk keluar dari sarangnya, kemudian dipindahkan ke dalam wadah penampung. Kriteria undur-undur yang diambil yaitu bobot lebih dari 15 mg per ekor dan masih dalam keadaan hidup. Undur-undur tidak dipakai jika bobot kurang 15 mg per ekor dan telah mati.

3.2.3 Ekstraksi Undur-undur

Ekstrak yang diambil adalah jenis ekstrak kasar disari dengan teknik perasan/jus, yaitu dengan cara menggerus 300 mg undur-undur dan ditambahkan DMSO 10% sebanyak 6 mL. Campuran tersebut kemudian disaring dengan kertas saring, selanjutnya ekstrak undur-undur disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm, diperoleh kadar ekstrak kasar undur-undur 50 mg/mL ⁽²⁴⁾.

3.2.4 Identifikasi Senyawa Peptida

Uji Biuret

Diambil 3 mL larutan sampel, masukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan NaOH 10% sebanyak 1 mL, diteteskan larutan CuSO₄ 0,1 % sebanyak 1-3 tetes. Diamati perubahan warna yang terjadi, ion Cu²⁺ membentuk kompleks berwarna biru hingga ungu dengan peptida pada suasana basa.

3.2.5 Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem

- a. Pembuatan larutan NaOH 0,1 M sebanyak 250 mL (untuk melarutkan hematin-porcine H3218 dan β-Hematin).

Kristal NaOH ditimbang sebanyak 1000 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL. Ditambahkan akuades sebanyak 100 mL, digojok hingga homogen, dan tambahkan akuades hingga tanda batas.

- b. Pembuatan larutan hematin 1 mM sebanyak 100 mL dalam larutan NaOH 0,1 M.

Kristal hematin ditimbang sebanyak 63,35 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan larutan NaOH 0,1 M sebanyak 50 mL, digojok hingga larut ditambahkan lagi larutan NaOH 0,1 M hingga tanda batas.

- c. Pembuatan kurva baku hematin

Seri kadar larutan hematin dibuat dengan konsentrasi 125 ; 62,5 ; 31,25 ; 15,6 ; 7,8 dan 3,9 μM. Masing-masing kadar dibuat sebanyak 400 μL.

Larutan hematin 125 μM dibuat dengan cara, diambil larutan hematin 1 mM sebanyak 50 μL dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi ukuran 1,5 mL, ditambahkan larutan NaOH 0,1 M sebanyak 350 μL dan dihomogenkan. Larutan tersebut dibuat seri kadar 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9 μM dengan melakukan pengenceran.

d. Pembuatan seri konsentrasi sampel

Larutan DMSO 10 % : Diambil sebanyak 1000 μL DMSO 100% dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan akuadest hingga tanda batas dan dihomogenkan

Sampel konsentrasi 50 mg/mL : ditimbang 300mg undur-undur, ditambahkan 6 mL DMSO 10%, digerus hingga halus, kemudian disaring.

Sampel dengan seri kadar 50,00 ; 25,00 ; 12,50 ; 6,25; 3,125 mg/mL : Seri kadar 50 mg/mL diambil dari larutan stok sampel. Pembuatan seri kadar selanjutnya dilakukan dengan cara diambil larutan seri 1 sebanyak 150 μL ditambahkan dengan 150 μL DMSO 10%. Dilakukan pengenceran dengan cara yang sama pada seri kadar selanjutnya, sehingga didapatkan seri kadar 50,00 ; 25,00 ; 12,50 ; 6,25; 3,125 mg/mL.

Kontrol Positif (Klorokuin 5 mg/mL) : Diambil sebanyak 5 mg Klorokuin difosfat dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi, ditambahkan DMSO 10% 1000 μL , dihomogenkan.

Kontrol Negatif (DMSO 10%) : Diambil DMSO 10% 1000 μL dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi.

Blanko (Akuades) : Diambil sebanyak 1 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi.

e. Uji penghambatan polimerisasi hem

Dimasukkan 100 μL larutan hematin 1 mM dalam NaOH 0,1 M ke dalam tabung mikrosentrifus, ditambahkan 50 μL larutan asam asetat glasial (pH 2,6), ditambahkan 50 μL bahan uji dengan berbagai tingkatan kadar ; kontrol positif; kontrol negatif; blanko diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit, dibuang supernatannya dan endapannya dicuci sebanyak 3 kali dengan 200 μL DMSO. Endapan yang dihasilkan ditambahkan 200 μL NaOH 0,1 M, dimasukkan ke dalam sumuran mikrokultur 96 sumuran sebanyak 100 μL dibaca pada λ 405 nm dengan *Elisa Reader* untuk mendapatkan absorbansi. Nilai aktivitas penghambatan polimerisasi hem dinyatakan dengan IC₅₀ dengan mensubstitusikan nilai 50 ke dalam persamaan regresi. IC₅₀ adalah kadar yang dapat menghambat polimerisasi hem hingga 50 % yang dibandingkan dengan kontrol negatif.

3.3 Analisis Hasil

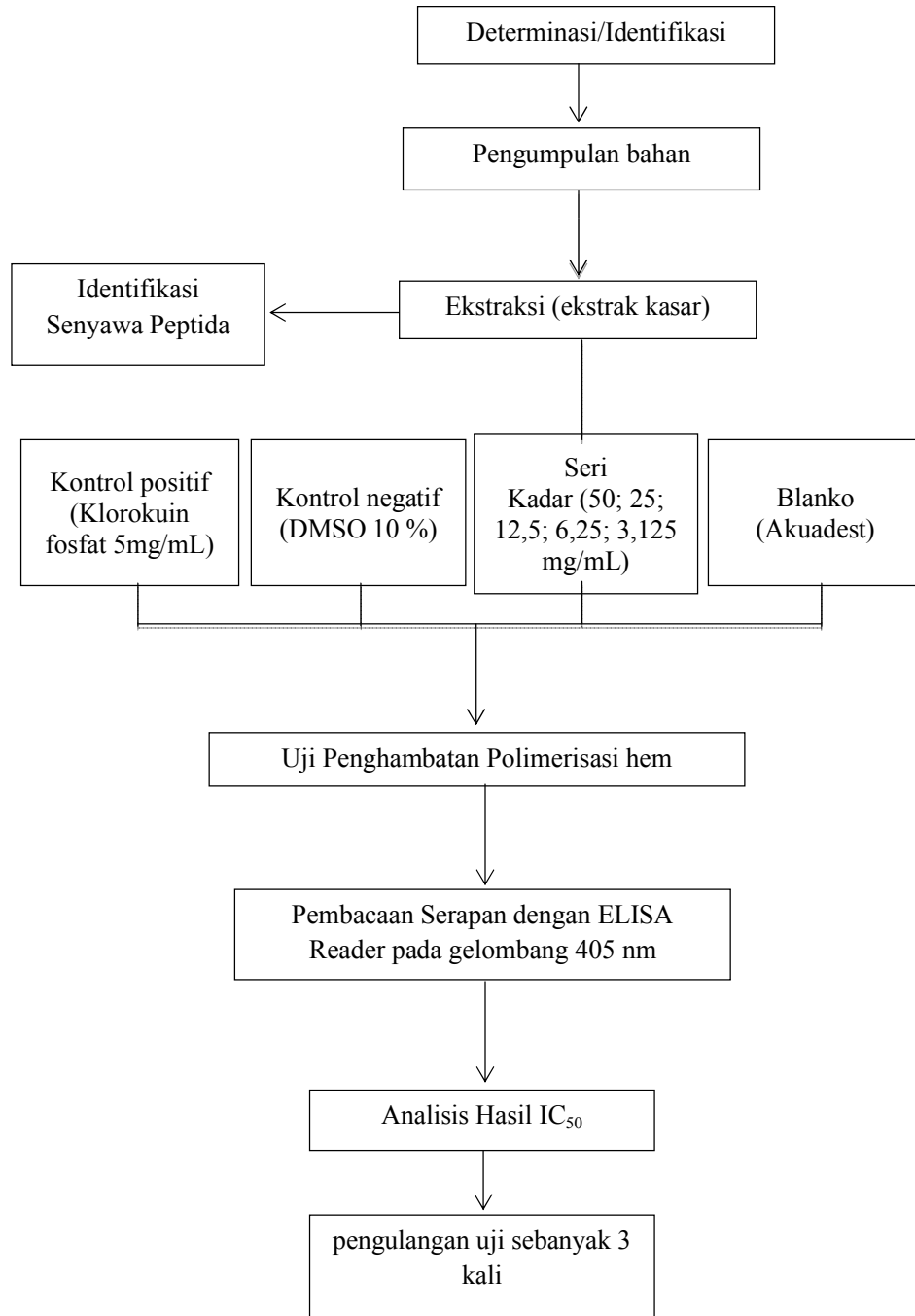
Aktivitas penghambatan polimerisasi hem dinyatakan dengan nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi. Suatu ekstrak berpotensi sebagai antimalaria jika memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$. Identifikasi senyawa peptida ditandai dengan terjadinya reaksi warna (ungu) pada sampel menggunakan metode biuret.

3.4 Definisi Operasional

1. Subyek uji adalah undur-undur (*Myrmeleon Sp*).
2. Penghambatan polimerisasi hem adalah nilai penghambatan polimerisasi hem yang dinyatakan dengan IC₅₀ yaitu konsentrasi senyawa uji yang mampu menghambat polimerisasi hem sebesar 50%.
3. Persentase penghambatan polimerisasi hem dihitung dengan rumus

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi bahan uji}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$

3.7 Bagan Penelitian



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem ekstrak undur-undur telah dilakukan sejak bulan Februari hingga April 2017. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Islam Indonesia. Proses yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pengumpulan bahan, identifikasi sampel, ekstraksi sampel, identifikasi senyawa peptida, dan uji penghambatan polimerisasi hem.

4.1 Pengumpulan bahan

Pengumpulan undur-undur, diambil langsung dari habitatnya yaitu terdapat pada halaman rumah warga di Desa Meces, Nganggung, dan Lodadi yang terletak di sekitar wilayah jalan kaliurang kilometer 12-14.



Gambar 12. Sarang undur-undur dan pengumpulan undur-undur

Dipilih lokasi ini karena habitat yang ditemukan sesuai dengan habitat yang tertera pada literatur, yaitu hidup di lingkungan yang kering, terdapat di pasir atau tanah yang berdebu dan membentuk pusaran sebagai sarangnya⁽⁴⁸⁾. Selain itu lokasi tersebut memiliki akses yang mudah dijangkau, dan ditemukan populasi undur-undur cukup banyak. Jumlah undur-undur yang diambil sebanyak 50 ekor dengan bobot minimal 15 mg per ekor. Penimbangan bobot sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Jurusan Farmasi UII.

Selanjutnya undur-undur dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan yang masih menempel pada tubuhnya. Undur-undur dikeringkan dengan tisu untuk meminimalisir kadar air agar tidak mempengaruhi bobot pada saat penimbangan. Sampel harus dipastikan tetap hidup sebelum proses ekstraksi berlangsung, untuk mencegah degradasi protein didalam tubuhnya. Setelah sampel terkumpul, selanjutnya harus dilakukan proses identifikasi untuk memastikan kebenaran sampel yang digunakan.

4.2 Identifikasi Undur-undur

Proses identifikasi penting dilakukan sebelum melakukan penelitian, dengan tujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan sesuai dengan jenis atau spesies yang diharapkan. Proses identifikasi harus dilakukan oleh para ahli dan telah mendapat lisensi dalam memberikan keterangan hasil.

Proses identifikasi undur-undur dilakukan di Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada dan disertai dengan surat keterangan identifikasi. Hasil identifikasi undur-undur didapatkan sebagai berikut :

Order : Neuroptera
Family : Myrmeleontidae
Superfamily : Myrmeleontoidea
Subfamily : Myrmeleontinae
Tribe : Myrmelontini
Genus : *Myrmeleon*
Species : *Myrmeleon Sp.*

Deskripsi hasil : Pada bagian kepala terdapat satu pasang capit, satu pasang mata majemuk, satu pasang antena, rahang depan, dan rahang belakang. Bagian badan berbentuk lonjong dengan ekor meruncing, memiliki bulu halus dan ruas-ruas. Jumlah kaki sebanyak 6 dan terdapat bulu halus di setiap kakinya.

Hasil identifikasi undur-undur tersebut sesuai dengan literatur, baik habitat maupun ciri-ciri anatominya ⁽⁴⁹⁾. Hasil tersebut juga diperkuat dengan surat keterangan identifikasi yang terlampir pada **Lampiran 1**. Sehingga disimpulkan bahwa sampel yang digunakan adalah undur-undur (*Myrmeleon Sp.*).

4.3 Ekstraksi Undur-undur

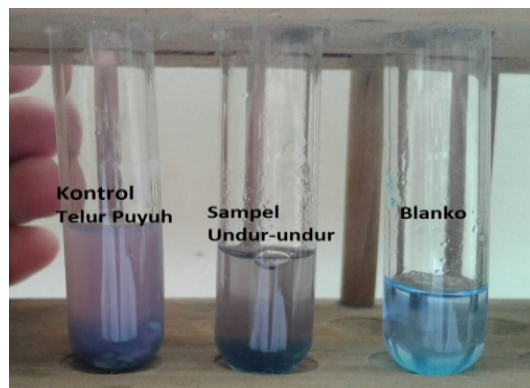
Ekstraksi undur-undur dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia. Penggunaan sampel undur-undur pada penelitian sebelumnya, mensyaratkan bahwa sampel harus dalam keadaan hidup dan harus dipastikan bahwa sampel tersebut adalah benar dengan melakukan identifikasi sebelum dilakukan ekstraksi⁽²¹⁾. Sampel undur-undur harus dipastikan tetap hidup sebelum proses ekstraksi dilakukan, hal ini diperhatikan untuk mencegah degradasi zat-zat yang terdapat pada tubuh undur-undur. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kasar, didapatkan dengan metode perasan/jus. Undur-undur terlebih dahulu ditimbang bobotnya sebanyak 300 mg, dipastikan bahwa semuanya dalam keadaan hidup. Penggerusan dilakukan di dalam lumpang bertujuan untuk mengeluarkan zat-zat yang terkandung di dalamnya. Kemudian ditambahkan pelarut DMSO 10% sebanyak 6 mL sambil digerus, untuk melarutkan zat-zat yang terkandung di dalam tubuhnya. Selanjutnya penyaringan menggunakan kertas saring bertujuan untuk memisahkan remahan tubuh dan kotoran lainnya, dilakukan sedikit perasan agar larutan mengalir dan ampas remahan undur-undur tersaring. Volume setelah penyaringan yaitu 4 mL, dengan konsentrasi 50 mg/mL.

Pada sampel hewani zat yang diduga memiliki aktivitas utama terdapat pada protein. Protein umumnya bersifat polar, sehingga pelarut yang digunakan harus bersifat polar. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan yaitu campuran akuades (9 bagian) dan DMSO (1 bagian). Campuran pelarut ini bersifat polar karena memiliki komposisi dominan akuades. Ditambahkan DMSO 10% yang merupakan pelarut organik universal, agar mampu menarik senyawa yang bersifat non polar. DMSO dipilih sebagai campuran akuades karena tidak toksik, tidak mencemari lingkungan, dan tidak mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi secara signifikan. Hasil ekstrak undur-undur tersebut dibuat beberapa seri kadaryaitu 50mg/mL, 25mg/mL, 12,5mg/mL, 6,25mg/mL dan 3,125mg/mL yang telah melalui proses optimasi sebelumnya. Seri kadar tersebut kemudian diujikan sebagai penghambat polimerisasi hem. Ekstrak undur-undur sebaiknya

digunakan dalam keadaan segar untuk mencegah terjadinya degradasi zat-zat yang terkandung di dalamnya.

4.4 Identifikasi Kandungan Senyawa Peptida

Metode yang digunakan dalam identifikasi kandungan senyawa peptida yaitu menggunakan metode Biuret. Metode ini biasanya digunakan untuk mengidentifikasi protein dalam suatu bahan. Metode ini mempunyai reaksi pembentukan kompleks terhadap senyawa peptida yang terdapat pada sampel, sedangkan peptida merupakan senyawa penyusun protein. Sehingga metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa peptida secara kualitatif.



Gambar 13. Identifikasi senyawa Peptida

Pada penelitian undur-undur, belum ditemukan identifikasi zat-zat yang terkandung di dalamnya. Akan tetapi, sebagian besar zat-zat yang berkhasiat sebagai pengobatan yang berasal dari sampel hewani terdapat pada protein. Di dalam protein terdapat polipeptida-polipeptida yang saling berikatan, sedangkan polipeptida tersusun atas peptida-peptida yang saling berikatan. Pada sampel undur-undur, zat aktif yang diduga memberikan efek sebagai penghambat polimerisasi hem adalah senyawa peptida. Karena telah ditemukan beberapa penelitian yang mengatakan bahwa, isolat senyawa dari golongan peptida sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai antimalaria⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾, misalnya senyawa peptida (*magainins dan cecropins*) yang telah terbukti memiliki aktivitas antimalaria⁽⁴⁹⁾. Penelitian lainnya mengatakan bahwa peptida yang diisolasi dari

lebah, lalat, kalajengking, laba-laba dan ulat sutera mempunyai aktivitas sebagai antimalaria, antimikroba, antitumor, antivirus dan berpotensi sebagai antikanker⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾, sehingga identifikasi peptida penting dilakukan.

Metode biuret merupakan metode warna, yang secara kualitatif dapat menentukan keberadaan senyawa peptida. Prinsip dari metode ini yaitu gugus –CO dan –NH pada ikatan peptida akan berikatan secara kovalen koordinasi dengan ion Cu^{2+} dari CuSO_4 dalam suasana basa, sehingga akan membentuk kompleks berwarna biru hingga ungu⁽⁵⁸⁾. Jika kompleks warna biru hingga ungu terbentuk, menandakan bahwa sampel mengandung senyawa peptida. Kontrol positif yang digunakan adalah telur puyuh, karena telah diketahui memiliki kandungan protein yaitu 15,99 %⁽⁶⁰⁾.

Hasil yang didapatkan dari pengujian ini yaitu terbentuk kompleks berwarna ungu pada pengujian dengan sampel undur-undur, kompleks berwarna ungu pada kontrol telur puyuh, dan tidak terbentuk kompleks pada blanko. Sehingga disimpulkan bahwa sampel undur-undur mengandung senyawa peptida.

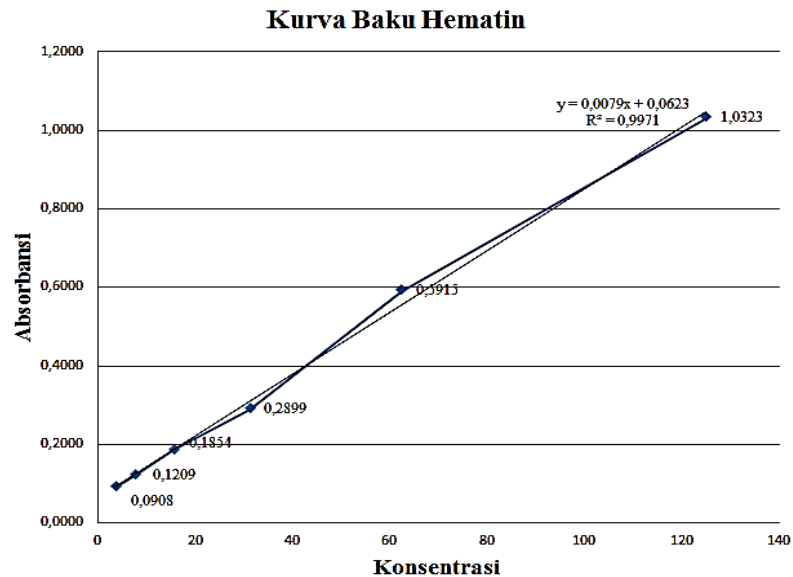
4.5 Uji Penghambatan Polimerisasi Hem

4.5.1 Kurva baku

Sebelum melakukan pengujian penghambatan polimerisasi hem, langkah pertama yang dilakukan adalah membuat dan mengukur kurva baku. Tujuan pengukuran kurva baku adalah untuk mendapatkan persamaan yang menghubungkan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi. Persamaan tersebut dapat digunakan untuk menentukan kadar β -hematin yang terbentuk dalam tiap pengujian. Kurva baku dibuat dari larutan hematin, dengan mencampurkan larutan hematin 1mM ditambahkan larutan NaOH 0,1 M.

Tabel 1. Kurva baku hematin

Konsentrasi (μM)	Absorbansi
125	1,0323
62,5	0,5915
31,25	0,2899
15,625	0,1854
7,8125	0,1209
3,90625	0,0908



Gambar 14. Grafik kurva baku

Pemilihan seri kurva baku hematin didapatkan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ^{(15)(16)(17) (18)}. Pengukuran kurva baku hematin menggunakan beberapa seri kadar yaitu, 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90625 μM , dan mendapatkan hasil absorbansi 1,0323; 0,5915; 0,2899; 0,1854; 0,1209; 0,0908 nm. Hasil tersebut dibuat grafik dengan variabel konsentrasi versus absorbansi, sehingga didapatkan grafik yang linear ditandai dengan semakin besar konsentrasi hematin, semakin besar pula absorbansinya dengan persamaan regresi $Y = 0,0079x + 0,0623$ dan nilai $R^2 = 0,9971$. Syarat suatu kurva baku dapat dipakai dalam penelitian adalah jika nilai R^2 mendekati nilai 1 (satu), sedangkan nilai R^2

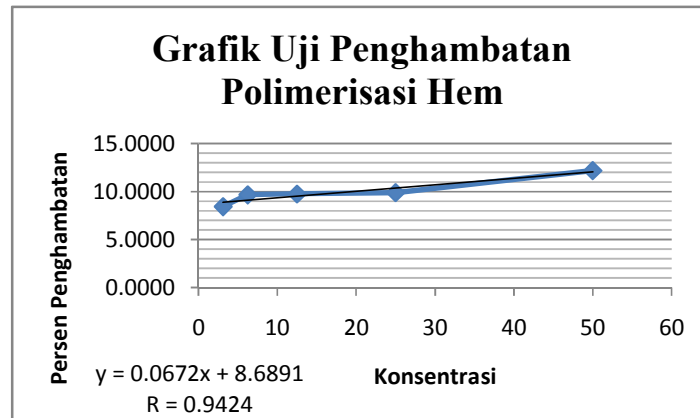
pada kurva baku adalah 0,9971, sehingga kurva baku ini dapat digunakan untuk penelitian.

4.5.2 Uji Penghambatan Polimerisasi Hem

Uji penghambatan polimerisasi hem menggunakan sampel undur-undur dengan konsentrasi 3,125 mg/mL; 6,25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; dan 50mg/mL, pemilihan konsentrasi sampel tersebut melalui proses optimasi. Kontrol negatif menggunakan akuades, karena tidak mempunyai reaksi penghambatan polimerisasi hem. Hasil pengujian berupa data absorbansi dibaca menggunakan *Elisa Reader* dengan panjang gelombang 405nm. Prinsip kerja *Elisa Reader* yaitu dengan memantulkan gelombang cahaya ke arah sampel, sehingga sampel akan menyerap gelombang tersebut, selanjutnya detektor akan menghitung gelombang cahaya yang diserap ditunjukkan dengan nilai absorbansi. Nilai absorbansi tersebut kemudian dimasukan ke dalam rumus persamaan kurva baku untuk menentukan kadar β -hematin yang terbentuk didalamnya. Dengan mengetahui kadar β -hematin yang terbentuk antara kontrol dan sampel, maka persen penghambatan sampel juga dapat diketahui. Hasil yang baik yaitu jika semakin tinggi konsentrasi sampel, semakin tinggi pula persen penghambatannya, dan perbandingan antara penurunan konsentrasi dengan penurunan persen penghambatan memiliki perbandingan yang tidak jauh berbeda.

Tabel 2. Hasil Uji Penghambatan Polimerisasi Hem

Konsentrasi (mg/mL)	Rerata Absorbansi \pm SD	Persen Penghambatan	IC50 (mg/mL)
50	2,1723 \pm 0,0751	12,1920	
25	2,2276 \pm 0,0590	9,8914	
12,5	2,2309 \pm 0,0163	9,7541	614,745
6,25	2,2327 \pm 0,3776	9,6771	
3,125	2,2623 \pm 0,0295	8,4452	



Gambar 15. Grafik Uji Penghambatan Polimerisasi Hem

Uji penghambatan polimerisasi hem merupakan salah satu pengujian mekanisme antimalaria. *Plasmodium* akan menguraikan hemoglobin pada eritrosit yang dapat diubah menjadi asam amino dan hem. Asam amino akan digunakan sebagai sumber makanan, sedangkan hem bersifat toksik bagi *Plasmodium*. Untuk mengatasi ketoksikan tersebut *Plasmodium* melakukan polimerisasi, mengubah hem menjadi kristal hemozoin yang bersifat tidak toksik. Tujuan pengujian ini adalah untuk melihat daya penghambatan sampel dalam mencegah polimerisasi hem pada *Plasmodium*, sehingga hem tidak dapat berubah menjadi hemozoin. Hem yang terakumulasi akan bersifat toksik bagi *Plasmodium* dan dapat mematikan *Plasmodium* tersebut.

Prinsip pengujian penghambatan polimerisasi hem yaitu dengan menggunakan kristal hematin yang dapat berubah menjadi β -hematin pada suasana asam dan mempunyai struktur yang mirip terhadap hemozoin. Hematin akan terlarut dalam suasana basa dengan menggunakan NaOH 0,2 mM, dan akan berubah menjadi β -hematin pada suasana asam menggunakan asam asetat glasial pH 2,6. Pengujian sampel diharapkan dapat menghambat pembentukan β -hematin. β -hematin yang terbentuk dicuci dengan DMSO sebanyak 3 kali untuk menghilangkan sisa-sisa reaksi, selanjutnya dilarutkan kembali dalam NaOH dan dibaca absorbansinya dengan *Elisa Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Jika absorbansi uji sampel lebih kecil daripada blanko, maka sampel tersebut memiliki aktivitas penghambatan pembentukan hem.

Berdasarkan hasil pengujian pada tabel 2, sampel undur-undur dengan konsentrasi secara berurut 3,125 mg/mL; 6,25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; dan 50mg/mL, mendapatkan hasil penghambatan polimerisasi hem sebesar 8,0749%; 9,6771%; 9,7541%; 9,8914% dan 12,1920%. Hasil penghambatan polimerisasi dari kelima sampel tersebut tidak memiliki selisih yang signifikan dan tidak sebanding dengan penurunan konsentrasi. Berdasarkan hasil tersebut dapat diduga bahwa ekstrak undur-undur tidak memiliki aktivitas sebagai penghambat polimerisasi hem, akan tetapi untuk memastikan hal itu diperlukan nilai IC_{50} .

Dalam hal ini IC_{50} dapat didefinisikan sebagai konsentrasi yang dapat menghambat 50% polimerisasi hem dari ekstrak undur-undur. Analisis hasil penelitian menggunakan persamaan regresi linear dengan variabel persen penghambatan versus konsentrasi ekstrak. Persamaan regresi yang didapatkan yaitu $y=0,0672x+8,6891$ dengan nilai $R=0,9424$. Nilai IC_{50} didapatkan dengan cara memasukkan nilai 50 sebagai nilai Y dan IC_{50} adalah nilai X⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾. Sehingga didapatkan IC_{50} dengan nilai 614,745 mg/mL, dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak undur-undur tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem, karena dikatakan bahwa suatu ekstrak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem adalah jika memiliki nilai IC_{50} dibawah 50 $\mu\text{g/mL}$ ⁽⁶²⁾.

Adapun faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil diatas diantaranya, ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kasar tanpa pengentalan. Ekstrak tidak dikentalkan karena, pada proses pengentalan akan melalui proses pemanasan, proses pemanasan tersebut akan mendegradasi protein yang terdapat pada ekstrak undur-undur⁽⁶³⁾. Penelitian ini dapat dilanjutkan kembali dengan melakukan ekstraksi dengan cara lain yang dapat menghasilkan ekstrak yang lebih kental misalnya dengan cara *freeze dry*. Faktor lainnya yaitu diduga sampel tidak mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi hem, oleh karena itu pada penelitian selanjutnya dapat melakukan pengujian dengan metode pengujian mekanisme antimalaria lainnya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hasil uji penghambatan polimerisasi hem menunjukkan bahwa ekstrak undur-undur tidak memiliki aktivitas penghambatan, karena nilai IC_{50} pada pengujian sebesar 614,745 mg/mL, sedangkan nilai IC_{50} minimum aktivitas adalah 50 μ g/mL.
2. Hasil identifikasi peptida menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa peptida yang ditunjukkan dengan terjadinya reaksi kompleks berwarna ungu pada larutan.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem ekstrak undur-undur ini, maka disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode ekstraksi yang berbeda, uji aktivitas terhadap *Plasmodium*, dan uji mekanisme antimalaria lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization, *Global Malaria Programme, World Health Organization*. World Malaria Report 2015. 2015.
2. *InfoDatin-Malaria-2016.pdf* [Internet]. [cited 2016 Nov 16]. Available from: <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/InfoDatin-Malaria-2016.pdf>
3. Menze BD, Riveron JM, Ibrahim SS, Irving H, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene PH, et al. *Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector Anopheles funestus from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations*. PLoS One. 2016;11(10):e0163261.
4. Djouaka R, Riveron JM, Yessoufou A, Tchigossou G, Akoton R, Irving H, et al. *Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector Anopheles funestus in Benin*. Parasit Vectors. 2016 Aug 17;9:453.
5. Hill AVS. *Vaccines against malaria*. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2011 Oct 12;366(1579):2806–14.
6. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. *Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med. 2009 Jul 30;361(5):455–67.
7. Travassos MA, Laufer MK. *Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacologic, and clinical considerations*. Pediatr Res. 2009 May;65(5 Pt 2):64R–70R.
8. Bloland PB. *Drug resistance in malaria* [Internet]. World Health Organization Geneva; 2001 [cited 2016 Nov 30]. Available from: <http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf?ua=1>
9. Departemen Kesehatan. *Buku saku Penatalaksanaan Kasus Malaria*. In Jakarta: Ditjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI; 2009.
10. Müller IB, Hyde JE. *Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance*. Future Microbiol. 2010 Dec;5(12):1857–73.
11. Zein U, Ginting Y, Saragih A, Hadisahputra S, Arrasyid NK, Yulfi H, et al. *Antimalaria effect of Chloroquin-Sambiloto (Andrographis paniculata Nees) Combination Compared Chloroquin Alone in Adult Patients of Uncomplicated Malaria Falciparum*. e-USU Repository. 2004 [cited 2016 Dec 6]; Available from: <http://library.usu.ac.id/download/fk/penydalam-umar3.pdf>
12. Schlesinger PH, Krogstad DJ, Herwaldt BL. *Antimalarial agents: mechanisms of action*. Antimicrob Agents Chemother. 1988 Jun;32(6):793–8.
13. Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klembe M, Goldberg DE. *Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jan 22;99(2):990–5.
14. Aini N, Soebaktiningsih S, Fitri LE, Kalsum U, Sumarno S. *Pengaruh Ekstrak Biji Nimba (Azadirachta Indica) Terhadap Penurunan Derajat*

- Parasit Dan Jumlah Hemozoin pada Kultur Plasmodium Falciparum*. J Kedokt Brawijaya. 2013;20(3):115–124.
15. Ulima Z. *Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi HEM Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Kembang Bulan (Tithonia diversifolia (Hamsley) A. Gray)*. In Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia; 2014.
 16. Nabila GK. *Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi HEM Ekstrak Etanol dan Fraksi Herba Bandotan*. In: Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia; 2014.
 17. Maslikhahsafa'ati A. *Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi HEM Ekstrak Etanol dan Fraksi Kayu Tanaman Akar Kuning (Arcangelisia flava (L.) Merr)*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia; 2014.
 18. Dewi LRK. *Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi HEM Ekstrak etanol dan Fraksi Daun Cincau Rambut (Cyclea barbata Miers)*. Universitas Islam Indonesia. 2014 Jun;
 19. Ravich S, Kathiresan K, Balaram H, others. *Anti-malarials from marine sponges*. Biotechnol Mol Biol Rev. 2007;2(2):33–38.
 20. Manley D. *4-H Entomology, Unit 4 Insect Identification*. South Carolina: Clemson University; 2001.
 21. Kurniasih T, Isma'il M, Susilowati F, Puji Lestari S. *Kajian Potensi Undur-undur darat (Myrmeleon sp) sebagai antidiabetes*. [Yogyakarta]: Universitas Gadjah Mada; 2010.
 22. Sutanto F. *Daya Hambat Ekstrak Metanol Undur-undur terhadap aktivitas Enzim α -Glukosidase sebagai antidiabetes*. Inst Pertan Bogor. 2008;
 23. Samitra D, Fakhur Rozi Z, Sanjaya. *Pengaruh Pemberian Jus Myrmeleon sp terhadap Kadar Trigliserida Mus Musculus Swiss Webster Jantan*. STKIP Lubuk Linggau. 2013;
 24. Yudan Tara A. *Ekstrak air undur-undur (Myrmeleon sp) sebagai Hepatoprotektor Tikus Jantan (Sprague-Dawley) yang diinduksi Parasetamol*. Inst Pertan Bogor. 2011;
 25. Bell A. *Antimalarial peptides: the long and the short of it*. Curr Pharm Des. 2011;17(25):2719–31.
 26. Nagaraj G, Uma MV, Shivayogi MS, Balaram H. *Antimalarial Activities of Peptide Antibiotics Isolated from Fungi*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jan;45(1):145–9.
 27. Pretzel J, Mohring F, Rahlfs S, Becker K. *Antiparasitic peptides*. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2013;135:157–92.
 28. Fan J, He J, Zhuang Y, Sun L. *Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of Tilapia (Oreochromis niloticus) frame protein*. Mol Basel Switz. 2012 Nov 1;17(11):12836–50.
 29. Crutcher JM, Hoffman SL. *Malaria*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2016 Dec 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8584/>
 30. White NJ. Plasmodium knowlesi: *The Fifth Human Malaria Parasite*. Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46(2):172–3.

31. Prevention C-C for DC and. *CDC - Malaria - About Malaria - Biology* [Internet]. [cited 2017 Jan 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
32. Miller LH, Howard RJ, Carter R, Good MF, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. *Research toward malaria vaccines*. *Science*. 1986 Dec 12;234(4782):1349–56.
33. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. *Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease*. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:217–49.
34. Lobo CA, Kumar N. *Sexual Differentiation and Development in the Malaria Parasite*. *Parasitol Today*. 1998 Apr 1;14(4):146–50.
35. Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, et al. *The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites*. *PLoS Med* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Dec 30];9(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3283556/>
36. Anonim. *Kepmenkes No.043 Tahun 2007 Pedoman Pengobatan Malaria.pdf*.
37. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. *Pharmacology of antimalarial drugs* [Internet]. World Health Organization; 2015 [cited 2016 Dec 6]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294433/>
38. Bloiland PB. *Drug resistance in malaria* [Internet]. World Health Organization Geneva; 2001 [cited 2017 Jan 16]. Available from: <http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf?ua=1>
39. Heinberg A, Kirkman L. *The molecular basis of antifolate resistance in Plasmodium falciparum: looking beyond point mutations*. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Apr;1342(1):10–8.
40. Yuthavong Y, Tarnchompoo B, Vilaivan T, Chitnumsub P, Kamchonwongpaisan S, Charman SA, et al. *Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 16;109(42):16823–8.
41. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. *Treatment Of Uncomplicated Malaria Caused By P. Vivax, P. Ovale, P. Malariae Or P. Knowlesi* [Internet]. World Health Organization; 2015 [cited 2016 Dec 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294428/>
42. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. *The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues*. *Mol Basel Switz*. 2010 Mar 12;15(3):1705–21.
43. Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. *Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments*. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):156–67.

44. Tie H, Walker BD, Singleton CB, Valenzuela SM, Bursill JA, Wyse KR, et al. *Inhibition of HERG potassium channels by the antimalarial agent halofantrine*. Br J Pharmacol. 2000 Aug;130(8):1967–75.
45. de Villiers KA, Marques HM, Egan TJ. *The crystal structure of halofantrine–ferriprotoporphyrin IX and the mechanism of action of arylmethanol antimalarials*. J Inorg Biochem. 2008 Aug;102(8):1660–7.
46. Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Lalloo DG, Fisher N, O’Neill PM, et al. *Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone*. J Antimicrob Chemother. 2013 May;68(5):977–85.
47. Basilico N, Pagani E, Monti D, Olliaro P, Taramelli D. *A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs*. J Antimicrob Chemother. 1998;42(1):55–60.
48. Pandey AV, Chausan VS. *Heme Polymerization by Malarial Parasite : A Potential Target For Antimalarial Drug Development*. 1998;9:911–2.
49. Eisner T, Baldwin I, Conner J. *Circumvention of prey defense by predator : antlion vs ant*. Proc Natl Aca Sci. 1993;90:6716–20.
50. Gwadz RW, Kaslow D, Lee JY, Maloy WL, Zasloff M, Miller LH. *Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes*. Infect Immun. 1989 Sep;57(9):2628–33.
51. Lacerda AF, Pelegrini PB, de Oliveira DM, Vasconcelos ÉAR, Grossi-de-Sá MF. *Anti-parasitic Peptides from Arthropods and their Application in Drug Therapy*. Front Microbiol. 2016;7:91.
52. Wu R, Chen L, Liu D, Huang J, Zhang J, Xiao X, et al. *Preparation of Antioxidant Peptides from Salmon Byproducts with Bacterial Extracellular Proteases*. Mar Drugs. 2017 Jan 11;15(1).
53. Vale N, Aguiar L, Gomes P. *Antimicrobial peptides: a new class of antimalarial drugs?* Front Pharmacol [Internet]. 2014 Dec 19 [cited 2017 Jun 5];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4271771>
54. Panda SS, Ibrahim MA, Küçükbay H, Meyers MJ, Sverdrup FM, El-Feky SA, et al. *Synthesis and antimalarial bioassay of quinine - peptide conjugates*. Chem Biol Drug Des. 2013 Oct;82(4):361–6.
55. Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, et al. *Antiviral and antitumor peptides from insects*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 1;99(20):12628–32.
56. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. *Antimicrobial peptides in insects; structure and function*. Dev Comp Immunol. 1999 Jul;23(4–5):329–44.
57. Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, et al. *Antiviral and antitumor peptides from insects*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 1;99(20):12628–32.
58. Scopes RK. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer Science & Business Media; 2013. 397 p.
59. Dudusola IO. *Comparative evaluation of internal and external qualities of eggs from quail and guinea fowl*. Int Res J Plant Sci. 2010;1(5):112–115.

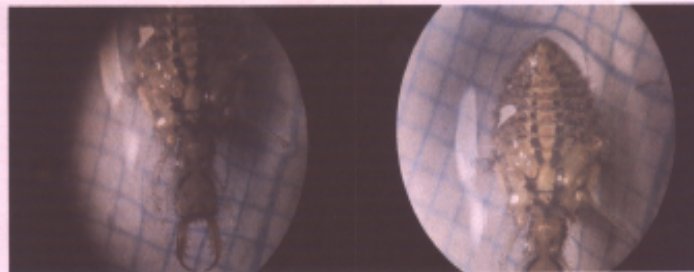
60. Sandhiutami Nmd, Indrayani Aw. *Antioxidant Activity Test and Determination of Phenolic and Flavonoid*. [cited 2017 Jun 14]; Available from:
<http://dosen.univpancasila.ac.id/dosenfile/2010211058136950403726May2013.pdf>
61. Rahmayani U, Pringgenies D, Djunaedi A. *Uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar keong bakau (*Telescopium telescopium*) dengan pelarut yang berbeda terhadap metode DPPH (diphenyl picril hidrazil)*. *J Mar Res*. 2013;2(4):36–45.
62. Baelmans R, Deharo E, Muñoz V, Sauvain M, Ginsburg H. *Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of beta-hematin*. *Exp Parasitol*. 2000 Dec;96(4):243–8.
63. Miratis ST, Sulistiyati TD, Suprayitno HE. *Pengaruh suhu pengukusan terhadap kandungan gizi dan organoleptik abon ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*)*. *J Mhs Teknol Has Perikan*. 2013 May 16;1(1):33–45.

LAMPIRAN 1. HASIL IDENTIFIKASI UNDUR-UNDUR

Myrmeleon sp.

Klasifikasi:

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Class : Insecta
Order : Neuroptera
Family : Myrmeleontidae
SuperFamily : Myrmeleontoidea
SubFamily : Myrmeleontinae
Tribe : Myrmeleontini
Genus : *Myrmeleon*
Species : *Myrmeleon* sp.



Deskripsi :

Margin anterior dari clypeo-labrum sedikit konkaf; mandibel dengan 3 gigi equidistant dengan bagian apikal paling kuat meskipun tidak terlalu terlihat; satu setae selalu ada setelah gigi apikal, margin eksternal dari mandibula terdapat setae panjang; palpus labialis secara normal sejumlah empat menyambung; pronotum tertutup oleh setae pendek dan kuat; meso dan metathorax dengan prosesus setiferous yang sesil; sternit pada segmen VIII abdominal dengan prosesus odontoid dan setae spiniform atau keras pada margin posterior; sternit pada segmen IX abdominal paling tidak dengan kelompok digging setae atau rastra pendek dengan dikelilingi 4 digging setae, pada beberapa spesies terdapat tambahan ventral digging setae.

Sumber:

Badano, D & R.A. Pantaleoni. The larva of European Myrmeleontidae[Neuroptera]. Zootaxa 3762 (1): 001 – 071.



LABORATORIUM ENTOMOLOGI
FAKULTAS BIOLOGI UGM
JOGYAKARTA

No. : BI/ ENT/ 3/ III / 2017
Hal : Hasil Identifikasi Serangga

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini , menerangkan bahwa mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia di Yogyakarta :

Nama : Candra Septiawan
NIM : 13613024
Fakultas : F.MIPA

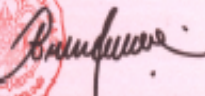
telah selesai melakukan identifikasi spesies serangga di laboratorium Entomologi Fakultas Biologi UGM, dibawah bimbingan :

1. Dr. R.C. Hidayat Soesilohadi, M. S.
2. Dr. Siti Sumarmi
3. Yhone Arialistya, S.Si.

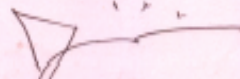
Surat Keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana perlunya.

Mengetahui
Dekan Fakultas Biologi UGM




Dr. Badi Setiadi Daryono, M. Agr. Sc.
NIP : 197003261995121001

Yogyakarta, 13 Maret 2017
Kepala Laboratorium Entomologi

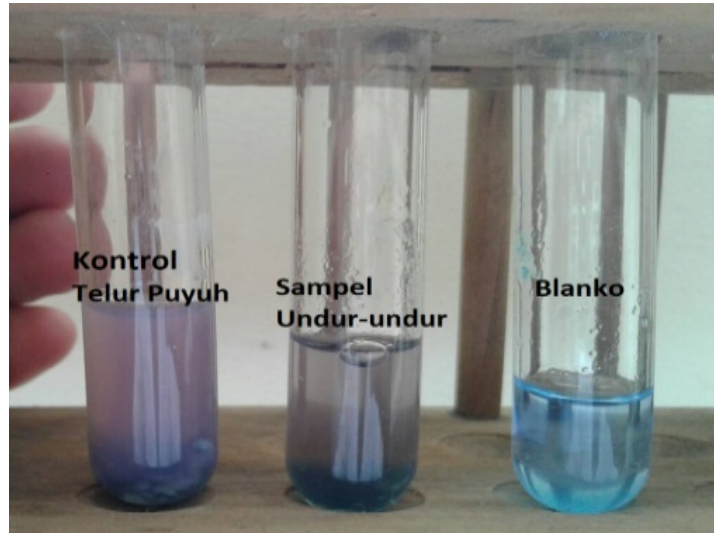


Dr. R.C. Hidayat Soesilohadi, M.S.
NIP : 195707081986031002

LAMPIRAN 2. EKSTRAKSI UNBUR-UNBUR



LAMPIRAN 3. IDENTIFIKASI SENYAWA PEPTIDA



LAMPIRAN 4. HABITAT UNDUR-UNDUR



LAMPIRAN 5. DATA PENELITIAN

Sampel	Absorbansi	Rerata	Kadar β Hematin	% Penghambatan
Sampel 1 (50 mg/mL)	2.2323	2.1723	267.0844	12.1920
	2.1965			
	2.0880			
Sampel 2 (25 mg/mL)	2.1858	2.2276	274.0823	9.8914
	2.2693			
Sampel 3 (12,5 mg/mL)	2.2193	2.2309	274.5000	9.7541
	2.2424			
Sampel 4 (6,25 mg/mL)	2.4997	2.2327	274.7342	9.6771
	1.9657			
Sampel 5 (3,125 mg/mL)	2.2832	2.2623	278.4810	8.4452
	2.2414			
Blanko (Aquadest)	2.4637	2.4652	304.1688	0.0000
	2.7121			
	2.2199			

LAMPIRAN 6. INSTRUMEN PENELITIAN



ELISA READER



SENTRIFUGATOR



INKUBATOR