

**AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEM DARI
EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN
LEGUNDI (*Vitex trifolia L.*)**

SKRIPSI

Untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)



KHANSA AISYAH FEBIANINDITA

21613268

**PROGRAM STUDI FARMASI PROGRAM SARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA**

YOGYAKARTA

2025

PERSETUJUAN PENDADARAN
**AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEM DARI
EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN
LEGUNDI (*Vitex trifolia L.*)**



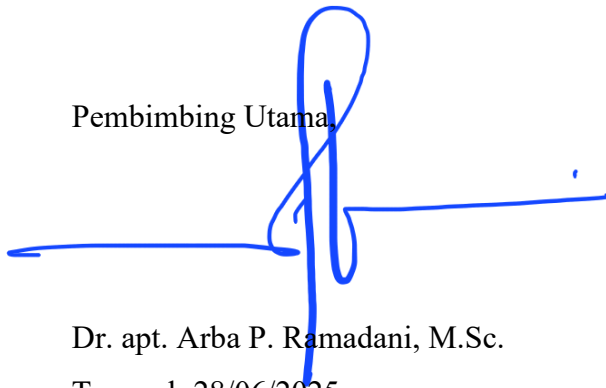
Yang diajukan oleh :

KHANSA AISYAH FEBIANINDITA

21613268

untuk dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Pembimbing Utama,



Dr. apt. Arba P. Ramadani, M.Sc.

Tanggal: 28/06/2025

Pembimbing Pendamping,



apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci.

Tanggal: 28/06/2025

SKRIPSI

**AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEM DARI EKSTRAK
ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN LEGUNDI (*Vitex trifolia L.*)**

Yang diajukan oleh :

KHANSA AISYAH FEBIANINDITA

21613268

Telah lolos uji etik penelitian
dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 22 Juli 2025

PEMBIMBING

Utama : Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, M.Sc.

Pendamping : apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci.

PENGUJI

Ketua : apt. Anami Riastri, M.Pharm.Sci.

Anggota : 1. Dr. apt. Rochmy Istikharah, M.Sc.

2. Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, M.Sc.

3. apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci.

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 27 Juni 2025

Penulis,



A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'K' followed by several loops and a vertical line ending in a horizontal stroke.

Khansa Aisyah Febianindita

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Prodi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan, dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, M.Sc. dan Ibu apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci. selaku dosen pembimbing yang telah dengan tulus memberikan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing, memberikan dukungan dan saran kepada saya selama proses penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian, hingga penulisan skripsi ini.
2. Ibu apt. Anami Riasri, M.Pharm.Sci. dan Dr. apt. Rochmy Istikharah, M.Sc. sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan kritik dan masukan yang sangat membangun dalam ujian skripsi saya.
3. Ibu apt. Novi Dwi Rugiarti, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang selama ini telah memberikan arahan, dukungan, doa, dan semangat sejak awal perjalanan akademik saya hingga akhirnya saya mampu menyelesaikan studi ini.
4. Seluruh Bapak/Ibu dosen Farmasi Universitas Islam Indonesia, atas ilmu yang telah ditanamkan, wawasan yang dibagikan, serta semangat dan doa yang tak ternilai harganya.
5. Seluruh laboran dan staf Laboratorium Biologi Farmasi, Mikrobiologi, dan LPOMK (Laboratorium Pengujian Obat, Makanan, dan Kosmetik) yang telah membantu memberikan arahan, dukungan, dan saran kepada saya, sehingga saya dapat melakukan penelitian dengan aman dan lancar.
6. Kedua orang tua saya, Bapak Agus dan Ibu Reny Sulistyowati, adik-adik saya, dan seluruh keluarga tercinta, yang tak pernah henti memberikan doa, dukungan, serta cinta dan semangat yang mengiringi tiap langkah saya.
7. Mbak Shofiatul Fuadah yang dengan tulus membantu, memberikan bimbingan, dan dukungan selama penelitian ini berlangsung.

8. Rekan-rekan seperjuangan dalam penelitian ini, Adhelia Wahyu Wiedayati, Fariza Fatimah Azzahro, Nayla Alkindi Mahadiva, Nanda Ghefira Az Zahra, dan Annisa Ameliana Silvia Mayasari yang telah kebersamai saya dalam proses penelitian ini. Terima kasih atas kerja sama, kebersamaan, serta semangat yang telah kita bangun bersama hingga akhir.
9. Seluruh teman-teman saya, yang telah menjadi bagian dari perjalanan ini, terima kasih atas doa, semangat, dan dukungan yang tulus selama proses penelitian ini berlangsung.

Akhir kata, saya berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu dan pengetahuan.

Yogyakarta, 27 Juni 2025



Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
INTISARI	xii
ABSTRACT	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Luaran Penelitian.....	2
1.5 Integrasi dengan Nilai Keislaman.....	2
1.6 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II KAJIAN PUSTAKA	4
2.1 Telaah Pustaka	4
2.1.1 Malaria	4
2.1.2 Penghambatan Polimerisasi Hem.....	6
2.1.3 Legundi (<i>Vitex trifolia</i> L.)	9
2.1.4 Sonikasi	10
2.1.5 Kromatografi Cair Vakum (KCV)	11
2.1.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	12
2.2 Landasan Teori	14
2.3 Hipotesis	14
2.4 Kerangka Konsep Penelitian	15
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Bahan Penelitian	16
3.2 Alat Penelitian	16
3.3 Cara Kerja Penelitian.....	16

3.3.1	Ekstraksi dan Fraksinasi.....	16
3.3.2	Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Legundi.....	17
3.3.3	Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.....	18
3.4	Analisis Hasil.....	24
3.4.1	Analisis Kualitatif.....	24
3.4.2	Analisis Kuantitatif.....	25
3.5	Alur Penelitian.....	27
	BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1	Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Legundi.....	28
4.2	Hasil Identifikasi Metabolit Sekunder.....	29
4.3	Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Legundi Terhadap Penghambatan Polimerisasi Hem.....	37
	BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1	Kesimpulan.....	41
5.2	Saran.....	41
	DAFTAR PUSTAKA.....	42
	LAMPIRAN.....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Siklus Hidup Parasit Malaria.....	5
Gambar 2.2. Mekanisme Penghambatan Polimerisasi Hem dalam Parasit.....	8
Gambar 2.3. Kromatografi Cair Vakum (KCV).....	12
Gambar 2.4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	13
Gambar 2.5. Kerangka Konsep Penelitian.....	15
Gambar 3.1. Skema Pengenceran Larutan Hematin.....	18
Gambar 3.2. Pembuatan Larutan Kurva Baku Hematin.....	19
Gambar 3.3. Pembuatan Larutan Sampel Fraksi Etil Asetat.....	21
Gambar 3.4. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol.....	22
Gambar 3.5. Pembuatan Larutan Uji dan Larutan Kontrol Negatif.....	22
Gambar 3.6. Prosedur Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.....	23
Gambar 3.7. Skema Penelitian.....	27
Gambar 4.1. Dokumentasi Visual Simplisia, Serbuk, Ekstrak Etanol, dan Fraksi Etil Asetat Daun Legundi.....	29
Gambar 4.2. Identifikasi Alkaloid.....	31
Gambar 4.3. Identifikasi Flavonoid.....	32
Gambar 4.4. Identifikasi Fenol.....	33
Gambar 4.5. Identifikasi Terpenoid.....	34
Gambar 4.6. Identifikasi Triterpenoid, Saponin, dan Steroid.....	35
Gambar 4.7. Grafik Kurva Baku Hematin.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Taksonomi <i>Vitex trifolia</i>	9
Tabel 3.1. Pereaksi Semprot dan Metabolit Sekunder yang Diidentifikasi.....	25
Tabel 4.1. Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun Legundi.	36
Tabel 4.2. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Fraksi Etil Asetat dan Ekstrak Etanol Daun Legundi.	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Simplisia Daun Legundi (<i>Vitex trifolia</i> L.).....	48
Lampiran 2. Hasil Pengamatan Warna Bercak dan Nilai Rf.....	50
Lampiran 3. <i>Mapping</i> Pembacaan Absorbansi Pada <i>Microplate</i> 96 Sumuran....	54
Lampiran 4. Kurva Baku Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.	55
Lampiran 5. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.	56
Lampiran 6. Analisis Statistik Probit dengan SPSS Versi 25.	57

**AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEM DARI
EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN LEGUNDI
(*Vitex trifolia* L.)**

Khansa Aisyah Febianindita
Program Studi Farmasi Program Sarjana

INTISARI

Latar belakang: Legundi (*Vitex trifolia* L.) merupakan tanaman dari famili Lamiaceae yang dikenal memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri, dan antioksidan. Senyawa bioaktif utamanya adalah flavonoid dan terpenoid, di mana gugus hidroksil flavonoid diduga berperan dalam penghambatan polimerisasi hem.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi serta mengidentifikasi metabolit sekundernya.

Metode: Identifikasi metabolit sekunder dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis berupa alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, steroid, dan triterpenoid. Sementara itu, uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem dilakukan menggunakan metode Basilico yang dimodifikasi.

Hasil: Ekstrak etanol daun legundi mengandung flavonoid, terpenoid, saponin, steroid, dan triterpenoid. Senyawa serupa juga teridentifikasi pada fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dan ekstrak etanol memiliki nilai IC_{50} sebesar $189,69 \pm 16,59$ $\mu\text{g/mL}$ dan $13,85 \pm 1,14$ $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan metabolit sekunder yang terkandung dalam kedua sampel.

Kesimpulan: Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat sama-sama mengandung flavonoid, terpenoid, triterpenoid, saponin, dan steroid. Kedua sampel tidak menunjukkan aktivitas dalam menghambat polimerisasi hem.

Kata kunci : *Vitex trifolia* L., ekstrak etanol, fraksi etil asetat, penghambatan polimerisasi hem

**HEME POLYMERIZATION INHIBITION ACTIVITY TEST OF
ETHANOL EXTRACT AND ETHYL ACETAT FRACTION OF LEGUNDI
LEAVES (*Vitex trifolia* L.)**

Khansa Aisyah Febianindita
Pharmacy Undergraduate Program

ABSTRACT

Background: Legundi (*Vitex trifolia* L.), a plant from the Lamiaceae family, is recognized for its cytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities. The main bioactive compounds found in legundi are terpenoids and flavonoids, where the hydroxyl group of flavonoids hypothesized to contribute to heme polymerization inhibitory activity.

Objective: This study aimed to assess the heme polymerization inhibitory activity of the ethanol extract and ethyl acetate fraction of legundi leaves and to identify its secondary metabolites.

Methods: Secondary metabolites, including alkaloids, flavonoids, terpenoids, saponins, steroids, and triterpenoids, were identified using thin-layer chromatography (TLC). The heme polymerization inhibition assay was conducted using a modified Basilico method.

Results: The ethanol extract was found to contain flavonoids, terpenoids, triterpenoids, saponins, and steroids. Similar compounds were also identified in the ethyl acetate fraction. The IC_{50} value of ethyl acetate fraction and ethanol extract was $189.68 \pm 16.6 \mu\text{g/m}$ and $13,85 \pm 1,14 \mu\text{g/mL}$, respectively. These differences may be attributed to the varying compositions of secondary metabolites present in each sample.

Conclusion: Ethanol extract and ethyl acetate fraction both contain flavonoids, terpenoids, triterpenoids, saponins, and steroids. However, neither sample demonstrated activity in inhibiting heme polymerization.

Keywords : *Vitex trifolia* L., ethanol extract, ethyl acetate fraction, HPIA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan di masyarakat yang mengancam jiwa dan disebarkan oleh beberapa jenis nyamuk. Pada tahun 2022, diperkirakan terdapat 249 juta kasus malaria di seluruh dunia dengan 1,156 juta kasus di Indonesia menurut World Malaria Report (2023). Indonesia masih menjadi negara endemi malaria (Felle & Sahiddin, 2024). Menurut data dari Badan Pusat Statistik (2024), kejadian malaria per 1000 orang pada tahun 2021 mengalami peningkatan dari tahun-tahun sebelumnya yaitu dari 0,940 pada tahun 2020 menjadi 1,120 per 1000 orang. *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) adalah standar pengobatan yang digunakan untuk mengobati malaria tanpa komplikasi (Kementerian Kesehatan RI, 2023a). Meski begitu, saat ini telah terjadi resistensi artemisinin terhadap *Plasmodium falciparum* yang tersebar luas di Asia Tenggara akibat adanya mutasi pada *kelch13*, sehingga perlu dilakukan pencarian obat antimalaria baru (Ashley dkk., 2014). Salah satu strategi yang dapat digunakan dalam menemukan obat antimalaria baru adalah melalui pemanfaatan bahan alam.

Legundi (*Vitex trifolia* L.) adalah salah satu tanaman yang diidentifikasi memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri, dan antioksidan (Garbi dkk., 2017; Manaf & Mohd Daud, 2016; Saklani dkk., 2017). Legundi diketahui mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid, flavonoid, fitosterol, antrakuinon, dan asam lemak, dengan terpenoid dan flavonoid diidentifikasi sebagai senyawa bioaktif utama dari legundi (Mottaghipisheh dkk., 2024). Etanol dipilih sebagai pelarut untuk ekstraksi karena bersifat universal, sehingga dapat menarik senyawa polar hingga non polar (Nurliansyah dkk., 2024). Ekstrak etanol daun legundi mengandung flavonoid, fenol, tanin, alkaloid, dan terpenoid. Pelarut n-heksana dan etil asetat digunakan untuk fraksinasi. Pemilihan kedua pelarut ini sebagai fase gerak bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritas senyawa tersebut (Nurani dkk., 2024). Fraksi etil asetat daun legundi mengandung senyawa steroid, saponin, fenol, tannin, dan terpenoid (Indrayudha & Cahyani, 2020). Gugus hidroksil dari senyawa golongan tanin, saponin, dan flavonoid diduga mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi (Arnida dkk., 2021). Hingga saat

ini, belum ada penelitian terkait aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari fraksi etil asetat legundi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan polimerisasi hem serta mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun legundi.

Sebagian besar obat antimalaria yang telah ada memiliki mekanisme aksi dalam menghambat polimerisasi hem, seperti klorokuin dan artemisinin (Pandey dkk., 1999; Zakiah dkk., 2021). Metode Basilico (1998) adalah salah satu metode berbasis mikrotiter untuk mengukur aktivitas penghambatan polimerisasi hem suatu obat. Metode ini dipilih sebagai metode penelitian karena dapat digunakan sebagai skrining awal untuk melihat aktivitas antimalaria.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (*Vitex trifolia* L.)?
2. Bagaimana aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (*Vitex trifolia* L.)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengkaji kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (*Vitex trifolia* L.).
2. Mengkaji aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (*Vitex trifolia* L.).

1.4 Luaran Penelitian

Luaran yang diharapkan dari penelitian ini adalah dihasilkannya artikel ilmiah yang dapat dipublikasikan secara daring, seminar nasional, maupun internasional.

1.5 Integrasi dengan Nilai Keislaman

Penelitian ini merupakan bentuk upaya ilmiah dalam mengkaji potensi tanaman obat sebagai sumber senyawa bioaktif alami. Melalui tumbuh-tumbuhan, Allah SWT menyediakan berbagai manfaat yang besar bagi kehidupan dan kesehatan

manusia. Hal ini mencerminkan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT sebagaimana dijelaskan dalam QS. An-Nahl ayat 11.

Allah Subhanahu wa Ta'ala berfirman:

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

“Dengan (air hujan) itu Dia menumbuhkan untukmu tumbuh-tumbuhan, zaitun, kurma, anggur, dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir.”

1.6 Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti, penelitian ini memberikan wawasan baru tentang potensi senyawa bioaktif dari tanaman legundi (*Vitex trifolia* L.) dalam penghambatan polimerisasi hem dan meningkatkan keterampilan laboratorium.
2. Bagi masyarakat, hasil penelitian ini berpotensi menyediakan alternatif sumber obat antimalaria dari bahan alami.
3. Bagi dunia penelitian, penelitian ini berkontribusi pada inovasi dalam pengembangan obat baru yang lebih efektif dan aman untuk pengobatan malaria.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Telaah Pustaka

2.1.1 Malaria

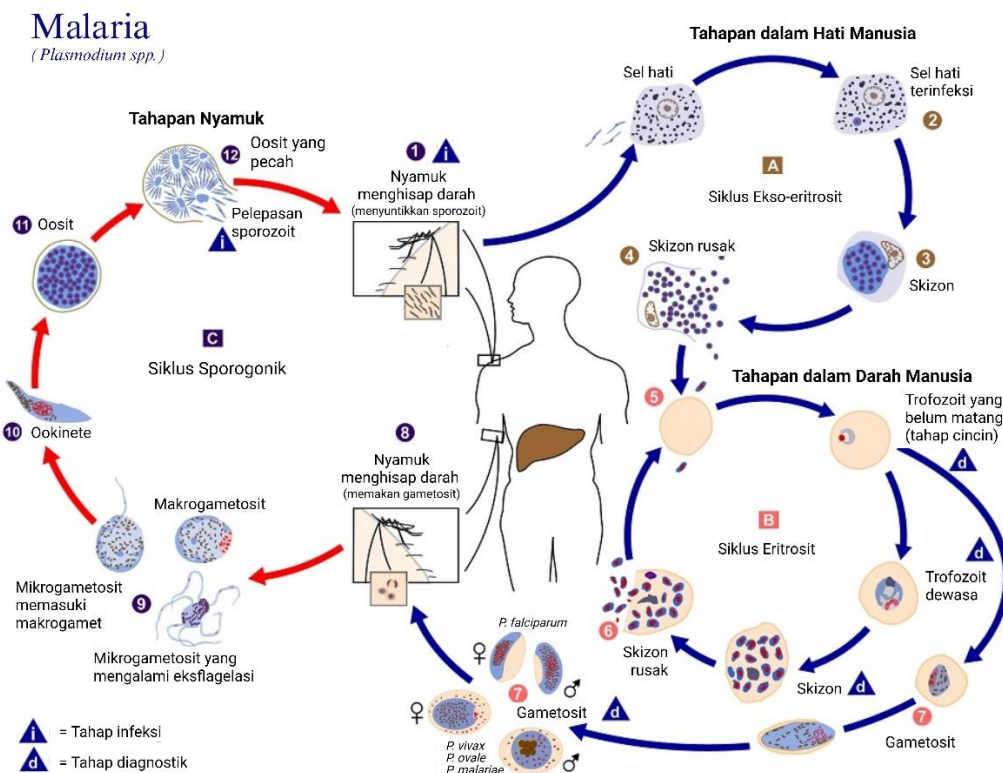
Indonesia masih menjadi negara endemi malaria dengan kasus paling banyak terjadi di Papua (Felle & Sahiddin, 2024; Kementerian Kesehatan RI, 2023b). Menurut data dari Badan Pusat Statistik (2024), kejadian malaria per 1000 orang pada tahun 2021 mengalami peningkatan dari tahun-tahun sebelumnya yaitu dari 0,940 pada tahun 2020 menjadi 1,120 per 1000 orang. Pemerintah Indonesia telah berusaha untuk memprioritaskan pemberantasan malaria yang dapat terlihat dari Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional (RPJMN) 2020-2024 dan Rencana Strategis Kementerian Kesehatan 2020-2024 (Kementerian Kesehatan RI, 2023b).

Malaria pada manusia dapat disebabkan oleh lima spesies parasit *Plasmodium*, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* dan *P. knowlesi* (Shibeshi dkk., 2020). Parasit tersebut dapat menular ke orang lain melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina (Kementerian Kesehatan RI, 2023a). Spesies yang paling banyak menjadi penyebab malaria di Indonesia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*. Parasit ini menyerang sel darah merah (eritrosit) manusia, menyebabkan gejala seperti demam tinggi, menggigil, dan anemia (Kementerian Kesehatan RI, 2023b). Malaria dapat mengakibatkan keguguran, kelahiran prematur (kelahiran prematur), bayi dengan berat lahir rendah (BBLR), dan bayi lahir mati pada wanita hamil (Kementerian Kesehatan RI, 2023a). Siklus hidup *Plasmodium* terdiri atas dua fase, yaitu fase aseksual dan seksual dan melibatkan dua inang seperti pada **Gambar 2.1**. (CDC-DPDx, 2024; Sucipto, 2015).

Fase aseksual dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina menggigit manusia dan sporozoit masuk ke dalam aliran darah hingga ke sel-sel hati manusia. Sporozoit memasuki sel parenkim hati dan berkembang membentuk skizon yang akan pecah dan melepaskan merozoit. Siklus ini disebut siklus skizogoni ekso-eritrosit, yaitu ketika parasit masih bereplikasi di hati dan belum masuk ke sel darah merah. Setelah satu sampai dua minggu, parasit kembali masuk ke peredaran darah, mengalami replikasi aseksual di eritrosit (skizogoni eritrosit) (CDC-DPDx, 2024;

Sucipto, 2015). Parasit memakan hemoglobin yang membawa oksigen sebagai sumber nutrisi. Pecahnya sel darah merah ini menyebabkan munculnya gejala seperti demam disertai menggigil dan anemia (Sucipto, 2015). Beberapa parasit mengalami diferensiasi menjadi bentuk seksual (gametosit).

Fase seksual dimulai ketika parasit dalam bentuk seksual masuk ke dalam perut nyamuk selama nyamuk *Anopheles* makan darah. Dalam fase ini, parasit mengalami pematangan menjadi mikrogametosit (jantan) dan makrogametosit (betina). Ketika mikrogametot menembus makrogametot di perut nyamuk, terjadi pembuahan yang menghasilkan zigot. Zigot akan menjadi motil dan memanjang (Ookinete). Ookinete dapat menembus dinding lambung nyamuk dan berkembang menjadi Ookista. Ketika Ookista pecah, ribuan sporozoit dilepaskan dan memasuki kelenjar air liur nyamuk untuk selanjutnya menular ke manusia. Siklus seksual ini disebut juga siklus sporogoni (CDC-DPDx, 2024; Sucipto, 2015).



Gambar 2.1. Siklus Hidup Parasit Malaria (CDC, 2024).

Terapi farmakologi untuk malaria dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu turunan kuinolon, antifolat, dan turunan artemisinin berdasarkan struktur kimia dan/atau mekanismenya. Mekanisme antimalaria turunan kuinolon merupakan hasil dari aktivitas yang terdiri dua langkah. Pada langkah pertama, hem

mengendap di permukaan kristal hemozoin dengan melapisi kristal yang sedang tumbuh. Pada langkah kedua, ia membentuk kompleks dengan hem bebas di dalam lumen vakuola pencernaan sehingga kristalisasi hem bisa dihentikan dan parasit terbunuh. Golongan antifolat terdiri antifolat kelas I dan II. Antifolat kelas I dapat menghambat dihidrofolat sintase (DHPS) dan kelas II dapat menghambat dihidrofolat reduktase (DHFR), sehingga sintesis asam nukleat akan terhambat. Artemisinin dan turunannya dapat berinteraksi dengan hem dalam parasit dan menjadikannya radikal bebas yang beracun bagi parasit. Radikal bebas ini dapat membunuh parasit dengan mengoksidasi dan mendenaturasi protein malaria esensial (Fikadu & Ashenafi, 2023). Meski begitu, saat ini telah terjadi resistensi artemisinin terhadap *Plasmodium falciparum* yang tersebar luas di Asia Tenggara akibat adanya mutasi pada gen *kelch13*. Gen ini berperan penting dalam fungsi sel parasit, terutama pada tahap cincin (*ring stage*) dari siklus hidup parasit. Artemisinin paling efektif melawan parasit pada tahap ini. Mutasi *kelch13* terjadi pada *P. falciparum* ditandai dengan waktu pembersihan parasit yang lebih lambat setelah pengobatan (*parasite clearance half-life* > 5 jam) (Ashley dkk., 2014).

Beberapa obat yang termasuk turunan kuinolon adalah klorokuin, amodiaquine, kina, quinidin, meflokuin, primaquine, lumefantrine, dan halofantrine (Fikadu & Ashenafi, 2023). Klorokuin digunakan sebagai terapi lini pertama untuk malaria akibat *P. vivax* dan *P. falciparum* di sebagian besar negara endemi malaria (Shibeshi dkk., 2020). Obat yang termasuk golongan antifolat kelas I adalah sulfadoksin, sedangkan obat yang termasuk golongan antifolat kelas II adalah proguanil dan pirimetamin. Beberapa turunan obat artemisinin adalah artesunat, artemether, arteether, dan dihidro-artemisinin (Fikadu & Ashenafi, 2023).

2.1.2 Penghambatan Polimerisasi Hem

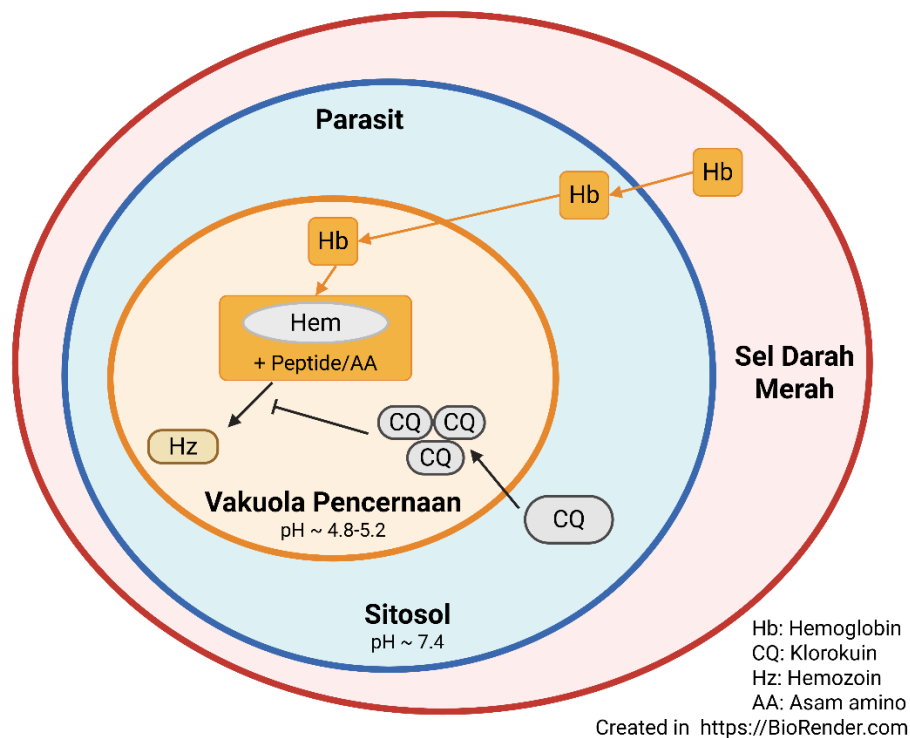
Pada fase aseksual, parasit malaria hidup di dalam sel darah merah inang yang terinfeksi dan memakan hemoglobin sebagai sumber nutrisi (Sucipto, 2015). Hemoglobin tersebut didegradasi oleh *Plasmodium* melalui pencernaan proteolitik dengan memanfaatkan asam amino. Degradasi ini memerlukan beberapa protease dalam prosesnya. Pembelahan awal yang bertujuan untuk mengubah sifat tetramer

hemoglobin dilakukan oleh protease aspartik dan plasmepsin I, diikuti oleh protease II. Proses ini memecah hemoglobin menjadi globin yang selanjutnya didegradasi menjadi peptida kecil oleh protease lainnya. Protease yang dikarakterisasi dari *P. falciparum* adalah protease sistein dan falcipain, yang memiliki peran penting dalam mendegradasi globin. Peptida kecil selanjutnya dipecah menjadi asam amino oleh protease serin. Proses degradasi ini menyebabkan dilepasnya sejumlah besar hem bebas toksin (Pandey & Chauhan, 1998).

Hem tidak menjadi racun ketika terletak di dalam hemoglobin dan berada dalam bentuk besi, tetapi ketika dilepaskan dari hemoglobin, hem dapat menjadi senyawa besi yang sangat beracun. Hem ini dapat menghambat protease vakular dan merusak membran parasit. Oleh karena itu, detoksifikasi hem diperlukan untuk memastikan kelangsungan hidup parasit malaria. Dalam tubuh inang, proses detoksifikasi ini terjadi ketika enzim hem oksigenase memecah hem dan membentuk biliverdin. Parasit malaria memiliki mekanisme tertentu untuk menghindari toksisitas hem. Di dalam vakuola makanannya, hem diubah menjadi hemozoin, yang dikenal sebagai 'pigmen malaria'. Pigmen hemozoin ini inert dalam parasit dan dilepaskan ke dalam sirkulasi darah inang setelah sel darah merah yang terinfeksi pecah pada akhir siklus hidup parasit. Hemozoin disimpan dalam jaringan inang yang terinfeksi (Pandey & Chauhan, 1998).

Agen antimalaria yang diketahui bekerja melalui mekanisme penghambatan polimerisasi hem adalah artemisinin dan klorokuin (Ekasari dkk., 2021; Zhou dkk., 2020). Gugus peroksida pada artemisinin memiliki peran penting dalam aktivitas antimalariannya. Ikatan endoperoksida yang dimilikinya dapat diaktifkan oleh hem tereduksi (FPFe^{2+}) atau ion besi dalam bentuk fero (Fe^{2+}), yang selanjutnya membentuk radikal karbon reaktif. Radikal ini bertindak sebagai agen alkilasi yang sangat kuat dan mampu menyerang berbagai makromolekul esensial di dalam parasit, yang pada akhirnya menyebabkan kematian parasit tersebut. Selain sebagai senyawa antimalaria, ikatan endoperoksida pada artemisinin juga berkontribusi terhadap aktivitas antikankernya. Meskipun tidak mutlak diperlukan untuk efek sitotoksik terhadap sel kanker, ketiadaan gugus endoperoksida terbukti menurunkan potensi sitotoksitasnya secara signifikan (Crespo-Ortiz & Wei, 2012).

Klorokuin telah terbukti efektif dapat menghambat pembentukan β -hematin pada ekstrak parasit, yang berperan dalam penghambatan polimerisasi hem (Slater & Cerami, 1992). Klorokuin dapat memberikan efek antimalaria baik pada tahap darah maupun pada tahap hati dari siklus hidup malaria (Milner, 2018). Obat ini bekerja dengan meningkatkan pH dan terakumulasi di dalam vakuola makanan parasit, yang mengakibatkan pelepasan senyawa toksik bagi parasit. Proses ini melibatkan oksidasi Fe(II)-protoporfirin IX (FeIIPPIX) menjadi Fe(III)-protoporfirin IX (FeIIIPPIX) atau hematin yang bersifat toksik, namun parasit memiliki kemampuan untuk mengubah hematin menjadi hemozoin dimer yang tidak beracun. Klorokuin dapat menghambat polimerisasi hematin menjadi hemozoin, sehingga mengganggu mekanisme detoksifikasi dan degradasi hemoglobin seperti yang tertera pada **Gambar 2.2**. Akibatnya, terjadi akumulasi hematin bebas yang bersifat toksik, yang merusak membran sel parasit dan akhirnya menyebabkan kematian parasit malaria (Zhou dkk., 2020).



Gambar 2.2. Mekanisme Penghambatan Polimerisasi Hem dalam Parasit (Tang dkk., 2019).

2.1.3 Legundi (*Vitex trifolia* L.)

Vitex trifolia L. yang dikenal sebagai legundi adalah tanaman yang tersebar luas dari India dan Sri Lanka hingga pantai utara Australia dan Tahiti. Legundi umumnya tumbuh di dataran rendah seperti tepi hutan bakau, pantai, rawa, hutan, dan padang rumput. Tumbuhan ini dapat berbentuk semak atau pohon kecil yang dapat tumbuh hingga 6,5 meter dengan kulit batang coklat muda atau abu-abu gelap, permukaan daun berwarna hijau muda hingga gelap-kusam, dan mahkota bunga berwarna ungu pucat (Sengun dkk., 2024). Di Indonesia, legundi sering digunakan untuk mengatasi diare, rematik, dan penghangat tubuh (Kementerian Kesehatan RI, 2023b). Taksonomi legundi dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1. Taksonomi *Vitex trifolia* (Rojas-Sandoval, 2022).

Tingkatan Taksonomi	Klasifikasi
Domain	Eukaryota
Kingdom	Plantae
Phylum	Spermatophyta
Subphylum	Angiospermae
Kelas	Dicotyledonae
Order	Lamiales
Famili	Lamiaceae
Genus	<i>Vitex</i>
Spesies	<i>Vitex trifolia</i>

Hingga saat ini, legundi diketahui mengandung lebih dari 180 metabolit. Senyawa utama yang teridentifikasi dalam legundi adalah terpenoid, flavonoid, dan iridoid (Mottaghipisheh dkk., 2024). Metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun legundi adalah senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, fitosterol, dan terpenoid (Ghafari dkk., 2022). Sementara itu, metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun legundi adalah steroid, saponin, fenol, tanin, dan terpenoid (Indrayudha & Cahyani, 2020). Gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa tanin, saponin, dan flavonoid diduga berperan dalam menghambat proses polimerisasi hem (Arnida dkk., 2021). Penghambatan polimerisasi hem dapat terjadi melalui dua kemungkinan mekanisme. Pertama, senyawa-senyawa seperti terpenoid, fenol, dan sterol dapat berinteraksi dengan sistem elektronik hem. Kedua, adanya senyawa yang mengandung gugus hidroksil dalam ekstrak

memungkinkan terbentuknya ikatan dengan ion besi hem, sehingga mengganggu proses pembentukan hemozoin (Purwanto, 2011).

Legundi diidentifikasi memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, hepatoprotektif (Garbi dkk., 2017; Manaf & Mohd Daud, 2016; Mottaghipisheh dkk., 2024; Saklani dkk., 2017). Menurut penelitian yang dilakukan Indrayudha & Cahyani (2020), ekstrak etanol dan fraksi n-heksana dari daun legundi memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara. Senyawa flavonoid, fenol, tannin, alkaloid, dan terpenoid adalah senyawa yang diduga berperan dalam aktivitas sitotoksik daun legundi (Indrayudha & Cahyani, 2020). Selain itu, ekstrak etanol dari *V. trifolia* dan *V. negundo* menunjukkan aktivitas antioksidan. Senyawa fenol dan flavonoid adalah senyawa yang diduga berperan dalam aktivitas antioksidan pada ekstrak *V. trifolia* dan *V. negundo* (Saklani dkk., 2017).

Viteosin-A dan viteksikarpin, yang merupakan metabolit primer aktif yang terkandung dalam ekstrak n-heksana legundi, menunjukkan aktivitas antispasmodik (Alam dkk., 2002). Viteksikarpin adalah senyawa identitas dari legundi (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Vitrifolin-A, yang merupakan metabolit utama dari ekstrak daun legundi, dipercaya memiliki peran krusial dalam meningkatkan aktivitas antimikroba pada ekstrak daun legundi. Senyawa ini dapat mengikat permukaan nanopartikel sehingga agen antimikroba menjadi lebih efektif dan tepat sasaran (Elumalai dkk., 2015).

2.1.4 Sonikasi

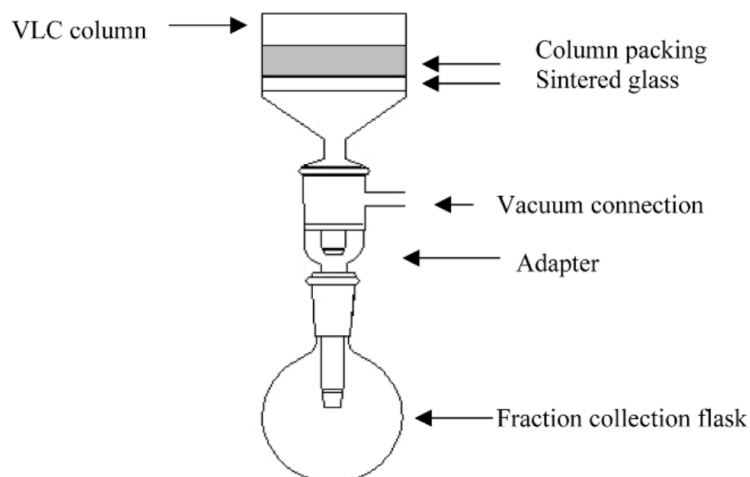
Sonikasi adalah metode yang memanfaatkan energi suara untuk mengaduk partikel dalam suatu sampel dengan berbagai tujuan (Candani dkk., 2018). Teknik ini disebut juga dengan ekstraksi ultrasonik (*ultrasound-assisted extraction*). Melalui proses ini, energi suara yang sangat tinggi (> 20 kHz) digunakan untuk menghancurkan struktur sel tumbuhan. Ini bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan material biologis sehingga memfasilitasi penetrasi pelarut secara lebih efektif. Akibatnya, senyawa metabolit sekunder dapat diekstraksi dan dilepaskan dengan lebih efisien (Triastuti, 2021). Dalam penelitian ini, metode sonikasi digunakan untuk mengekstraksi daun legundi (*Vitex trifolia* L.). Karena metode ini

dapat mempercepat proses ekstraksi dengan memecah interaksi antarmolekul, menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibanding metode maserasi dan sokhletasi, alat yang digunakan sederhana, dan partikel yang dihasilkan memiliki ukuran yang seragam (Candani dkk., 2018; Handaratri & Yuniati, 2019; Inggarwati dkk., 2020).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ghafari dkk. (2022), ekstrak etanol daun legundi yang diekstraksi menggunakan metode sonikasi akan memberikan hasil positif terhadap uji Dragendorff, alkalin, besi klorida, Liebermann-Burchard, dan Salkowski. Ini menandakan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, fitosterol, dan terpenoid. Sementara itu, senyawa yang diduga berperan dalam aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun legundi adalah flavonoid, fenol, tannin, alkaloid, dan terpenoid (Indrayudha & Cahyani, 2020). Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan metode sonikasi dengan pelarut etanol untuk mengekstraksi daun legundi.

2.1.5 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum (KCV) merupakan teknik pemisahan atau fraksinasi yang dilakukan dalam kondisi vakum secara terus-menerus hingga mencapai kerapatan kemasan yang maksimum atau dapat juga menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju alir fase gerak. KCV adalah modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi (Hermastuti, 2017). Metode ini dianggap sebagai kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Karena pemisahannya dilakukan pada silika gel kelas KLT atau aluminium oksida, dan kolom dikeringkan setelah setiap fraksi serupa dengan plat KLTP, kemudian dikeringkan dan dinyalakan kembali untuk meningkatkan pemisahan. KCV dapat diterapkan untuk pemisahan campuran dalam jumlah kecil maupun besar (Maurya, 2018). Komponen yang terdapat dalam KCV dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.



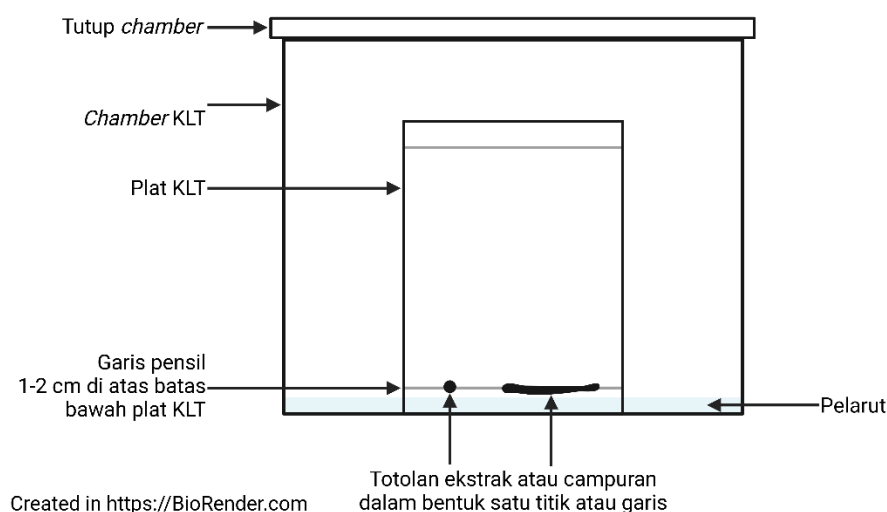
Gambar 2.3. Kromatografi Cair Vakum (KCV) (Reid & Sarker, 2006).

Pemisahan menggunakan KCV dapat dilakukan dengan kolom kromatografi yang dihubungkan dengan pompa vakum, yang mengandung isian (adsorben) kolom silika gel (10-40 μm) (Hermastuti, 2017). Adsorben yang umum digunakan dalam KCV adalah silika gel kelas KLT (silika gel H) atau aluminium oksida, namun adsorben lain juga dapat digunakan sesuai dengan profil KLT (Maurya, 2018). Dalam KCV, sampel berbentuk cairan lebih disukai karena prosesnya lebih mudah dan cepat. Jika sampel berbentuk padatan, maka sampel tersebut harus dilarutkan terlebih dahulu menggunakan pelarut yang tidak polar. Tekanan vakum yang digunakan berkisar antara 20-70 mmHg untuk mencegah hilangnya pelarut akibat penguapan (Maurya, 2018). Hasil pemisahan dari kromatografi vakum cair adalah fraksi-fraksi yang dapat dikelompokkan menjadi kelompok senyawa non polar, semipolar dan polar (Hermastuti, 2017). Pelarut etil asetat dapat menarik senyawa steroid, saponin, fenol, tannin, dan terpenoid dari daun legundi (Indrayudha & Cahyani, 2020).

2.1.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode kromatografi yang sederhana dan mudah untuk dilakukan. Prinsip alat ini yaitu pemisahan senyawa multi komponen menggunakan fase diam dan fase gerak akibat adanya proses adsorpsi (penyerapan) dan pemisahan senyawa (Agustin dkk., 2021; Purwanitingsih dkk., 2023). Kemampuan menyerap dari fase diam terhadap masing-masing senyawa kimia berbeda-beda tergantung tingkat kepolarannya,

sehingga dengan adanya perbedaan daya serap ini, akan terjadi pemisahan dari masing-masing komponen. Pada kromatografi, jarak migrasi suatu senyawa dinyatakan dengan nilai *retention factor* (Rf). Nilai Rf merupakan perbandingan antara jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik awal penotolan hingga posisi akhir bercak dengan jarak total yang ditempuh pelarut. Nilai ini berfungsi sebagai salah satu indikator untuk mengidentifikasi suatu senyawa. Secara teoritis, nilai Rf berada dalam rentang 0 hingga 1. Gambar dan komponen yang terdapat dalam KLT dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Gibbons, 2006).

Pada penelitian ini, fase gerak yang digunakan untuk KLT adalah n-heksana dan etil asetat P dengan perbandingan 2:1, sedangkan fase diamnya adalah silika gel 60 F₂₅₄ (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Setelah dilakukan pemisahan senyawa viteksikarpin menggunakan metode ini, visualisasi bercak dilakukan terhadap plat KLT secara visibel dan ultraviolet (UV) menggunakan UV-cabinet. Identifikasi senyawa organik pada plat KLT dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi pewarna. Pada penelitian ini, senyawa metabolit sekunder yang akan diidentifikasi dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi adalah alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, steroid, dan triterpenoid. Identifikasi ini dilakukan menggunakan pereaksi semprot Dragendorff untuk alkaloid, AlCl₃ 5% untuk flavonoid, FeCl₃ 1% untuk fenol, vanillin-asam sulfat untuk terpenoid, dan Liebermann-Burchard untuk saponin, steroid, dan triterpenoid (Indrayudha &

Cahyani, 2020; Oleszek dkk., 2008; Suhaenah & Nuryanti, 2017; Wagner dkk., 1984).

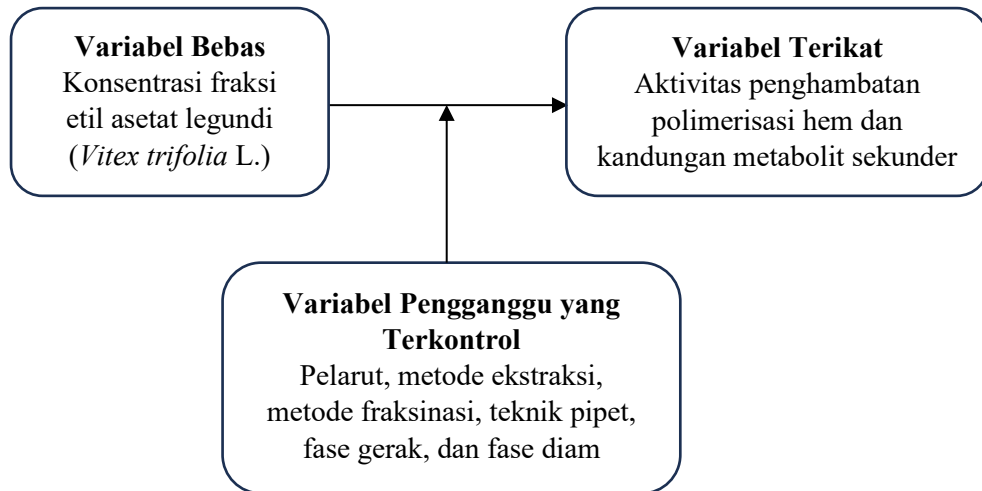
2.2 Landasan Teori

Legundi (*Vitex trifolia* L.) diidentifikasi memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, hepatoprotektif (Garbi dkk., 2017; Manaf & Mohd Daud, 2016; Mottaghipisheh dkk., 2024; Saklani dkk., 2017). Senyawa utama yang teridentifikasi dalam legundi adalah terpenoid, flavonoid, dan iridoid (Mottaghipisheh dkk., 2024). Dalam ekstrak etanol daun legundi terkandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, fitosterol, dan terpenoid (Ghafari dkk., 2022). Sementara itu, dalam fraksi etil asetat daun legundi terkandung senyawa steroid, saponin, fenol, tanin, dan terpenoid (Indrayudha & Cahyani, 2020). Gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa tanin, saponin, dan flavonoid diduga berperan dalam menghambat proses polimerisasi hem (Arnida dkk., 2021). Mekanisme kerja gugus hidroksil dari senyawa-senyawa dalam ekstrak tersebut diperkirakan melibatkan interaksi dengan ion besi pada molekul hem, sehingga menghambat konversi hem toksik menjadi bentuk tidak toksik, yaitu hemozoin (Purwanto, 2011).

2.3 Hipotesis

1. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (*Vitex trifolia* L.) diduga mengandung metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, triterpenoid, saponin, dan steroid.
2. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (*Vitex trifolia* L.) diduga memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem.

2.4 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.5. Kerangka Konsep Penelitian.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan utama berupa simplisia kering daun legundi (*Vitex trifolia* L.) yang dipesan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, etanol 96% teknis (Brataco[®]), silika gel 60 G (Supelco[®]), etil asetat teknis (Bratachem[®]), n-heksana teknis (Bratachem[®]), etil asetat pa (Supelco[®]), n-heksana pa (Supelco[®]), Dragendorff (Merck[®]), Liebermann-Buchard (Merck[®]), AlCl₃ (Supelco[®]), FeCl₃ (Supelco[®]), vanillin (Merck[®]), asam sulfat (Supelco[®]), silika gel 60 F₂₅₄ (Supelco[®]), kertas saring, kristal natrium hidroksida (NaOH) (Supelco[®]), hematin porcine (Sigma-Aldrich[®]), asam asetat glasial (Supelco[®]), dimetil sulfoksida (DMSO) (Supelco[®]), *microtube* 1,5 mL (Biologix[®]), *blue tip* (Extra GENE[®]), *yellow tip* (Biologix[®]), *white tip* (Axygen[®]), *microplate* 96 sumuran (Iwaki[®]), aluminium foil (Total Wrap[®]), dan akuades.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Mettler Toledo[®]), peralatan gelas (Iwaki[®] dan Pyrex[®]), *rotary evaporator* (Heidolph[®] dan Lauda[®]), lemari pendingin (Sharp[®]), inkubator CO₂ (ESCO[®]), UV-cabinet (Camag[®]), *waterbath* (Mettmert[®]), lemari asam (I-Blush[®]), pompa vakum (Gast[®]), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) *reader* (Thermo Scientific[®]), sonikator (GT Sonic[®]), vortex (Biologix[®]), rak *microtube* (Biologix[®]), sentrifugator (Thermo Scientific[®]), mikropipet (DragonLab[®]), KLT densitometer (Camag[®]), *moisture analyzer* (Mettler Toledo[®]), *hot plate* (Thermo Scientific[®]), oven (Mettmert[®]), *grinder* (Miller Achine[®]), dan IBM SPSS (*Statistical Program Software System*) Statistics versi 25.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

3.3 Cara Kerja Penelitian

3.3.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Simplisia kering legundi (*Vitex trifolia* L.) dihaluskan menggunakan *grinder*. Hasil serbuknya kemudian diekstraksi dengan sonikator (40 kHz) bersuhu 40°C selama 30 menit menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan serbuk dan

pelarut sebesar 1 banding 10. Hasil ekstraknya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, lalu ditimbang ekstrak kental yang diperoleh untuk dihitung rendemen ekstraknya. Ekstrak kental selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin untuk difraksinasi dan diidentifikasi senyawa metabolit sekundernya (Ghafari dkk., 2022).

Ekstrak kental legundi selanjutnya difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). Sebanyak 40 gram silika gel dimasukkan ke dalam kolom KCV dengan bagian bawahnya diberi kertas saring. Ekstrak kental sebanyak 4 gram dicampurkan dengan 8 gram silika gel menggunakan mortir dan stamper hingga kering. Campuran ekstrak dan silika gel ini kemudian dimasukkan ke dalam kolom VLC. Selanjutnya, kolom dielusi dengan pelarut n-heksana hingga warnanya menjadi bening, lalu dielusi kembali dengan pelarut etil asetat hingga bening. Hasil fraksi yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, lalu ditimbang fraksi kental yang diperoleh untuk dihitung rendemennya. Fraksi kental selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin untuk diuji aktivitas penghambatan polimerisasi hemnya dan diidentifikasi senyawa metabolit sekundernya (Wusu dkk., 2022).

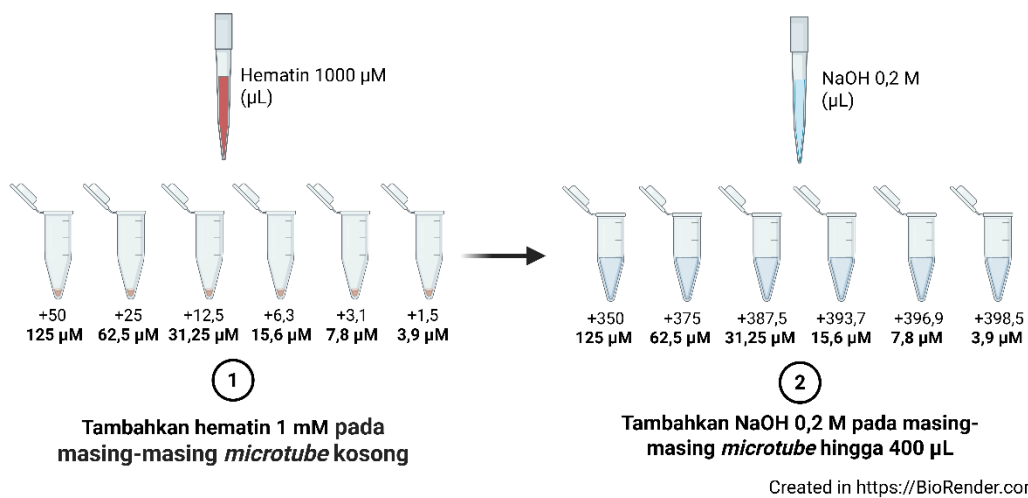
3.3.2 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Legundi

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi diidentifikasi metabolit sekundernya menggunakan silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak n-heksana dan etil asetat (2:1) (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Ekstrak dan fraksi legundi ditotolkan pada silika gel 60 F₂₅₄ dan dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak. Silika gel 60 F₂₅₄ dielusi selama beberapa saat dan dikeringkan. Dragendorff, AlCl₃, FeCl₃, Liebermann-Burchard, dan vanillin-asam sulfat digunakan sebagai pereaksi semprot untuk identifikasi alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, triterpenoid, saponin, dan steroid (Indrayudha & Cahyani, 2020; Oleszek dkk., 2008; Suhaenah & Nuryanti, 2017; Wagner dkk., 1984; Widyaningrum & Ningrum, 2021). Visualisasi bercak dilakukan di bawah sinar tampak, sinar UV 254 nm, dan sinar UV 366 nm menggunakan *UV-cabinet*. Selain

itu, masing-masing totalan diukur jarak bercak dan pelarutnya untuk menghitung nilai Rf.

3.3.3 Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem

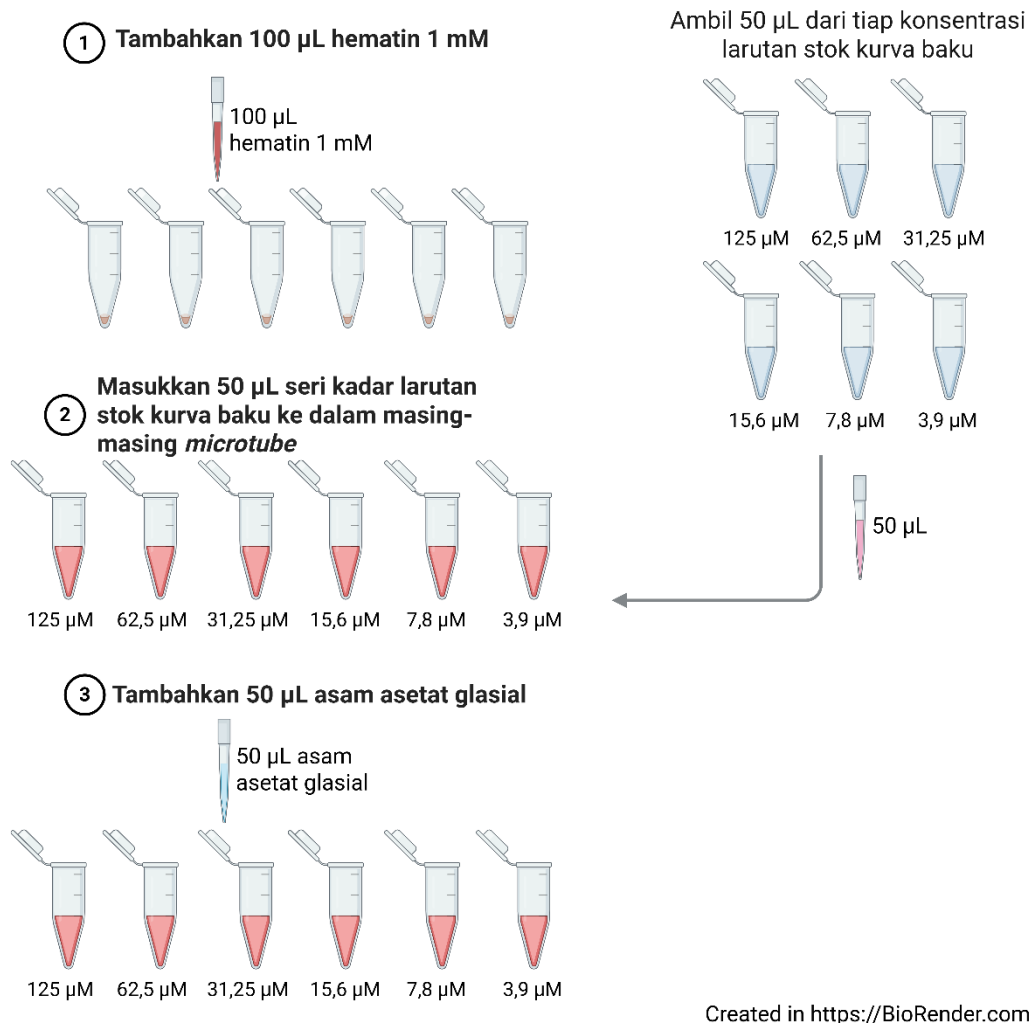
Metode yang digunakan dalam penelitian ini untuk menguji aktivitas penghambatan polimerisasi hem adalah metode Basilico (1998) yang dimodifikasi. Larutan NaOH 0,1 M sebanyak 250 mL dibuat dengan cara mencampur 1.000 mg kristal NaOH dan 100 mL akuades dalam gelas beker, diaduk, dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan NaOH 0,2 M dibuat dengan cara yang sama, namun kristal NaOH yang ditambahkan sebanyak 2.000 mg. Larutan hematin 1.000 μM sebanyak 5 mL dalam NaOH 0,2 M dibuat dengan cara mencampurkan 3,2 mg kristal hematin dan 5 mL larutan NaOH 0,2 M dalam *falcon tube* 15 mL dan divortex. Larutan DMSO 10% sebanyak 250 mL dibuat dengan cara menambahkan 25 mL DMSO 100% ke dalam labu ukur 250 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.



Gambar 3.1. Skema Pengenceran Larutan Hematin.

Larutan hematin diencerkan dengan konsentrasi 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8 dan 3,9 μM dibuat sebanyak 400 μL tiap konsentrasinya seperti pada **Gambar 3.1**. Larutan hematin 125 μM dibuat dengan cara masukkan 50 μL hematin 1.000 μM dan ditambahkan 350 μL NaOH 0,2 M. Larutan hematin konsentrasi 62,5; 31,25; 15,6 ; 7,8 dan 3,9 μM dibuat dengan cara yang sama, namun dengan jumlah larutan yang berbeda seperti yang tertera pada **Gambar 3.1**. Larutan kurva baku hematin

konsentrasi 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8 dan 3,9 μM dibuat dengan larutan hematin yang telah dibuat sebelumnya. Larutan kurva baku hematin konsentrasi 125 μM dibuat dengan cara dimasukkan 100 μL hematin 1.000 μM pada *microtube* kosong, ditambahkan 50 μL larutan hematin 125 μM yang sudah dibuat sebelumnya, dan ditambahkan 50 μL asam asetat glasial. Larutan kurva baku hematin konsentrasi 62,5; 31,25; 15,6 ; 7,8 dan 3,9 μM dibuat dengan cara yang sama, namun dengan jumlah larutan yang berbeda seperti yang tertera seperti pada **Gambar 3.2**.



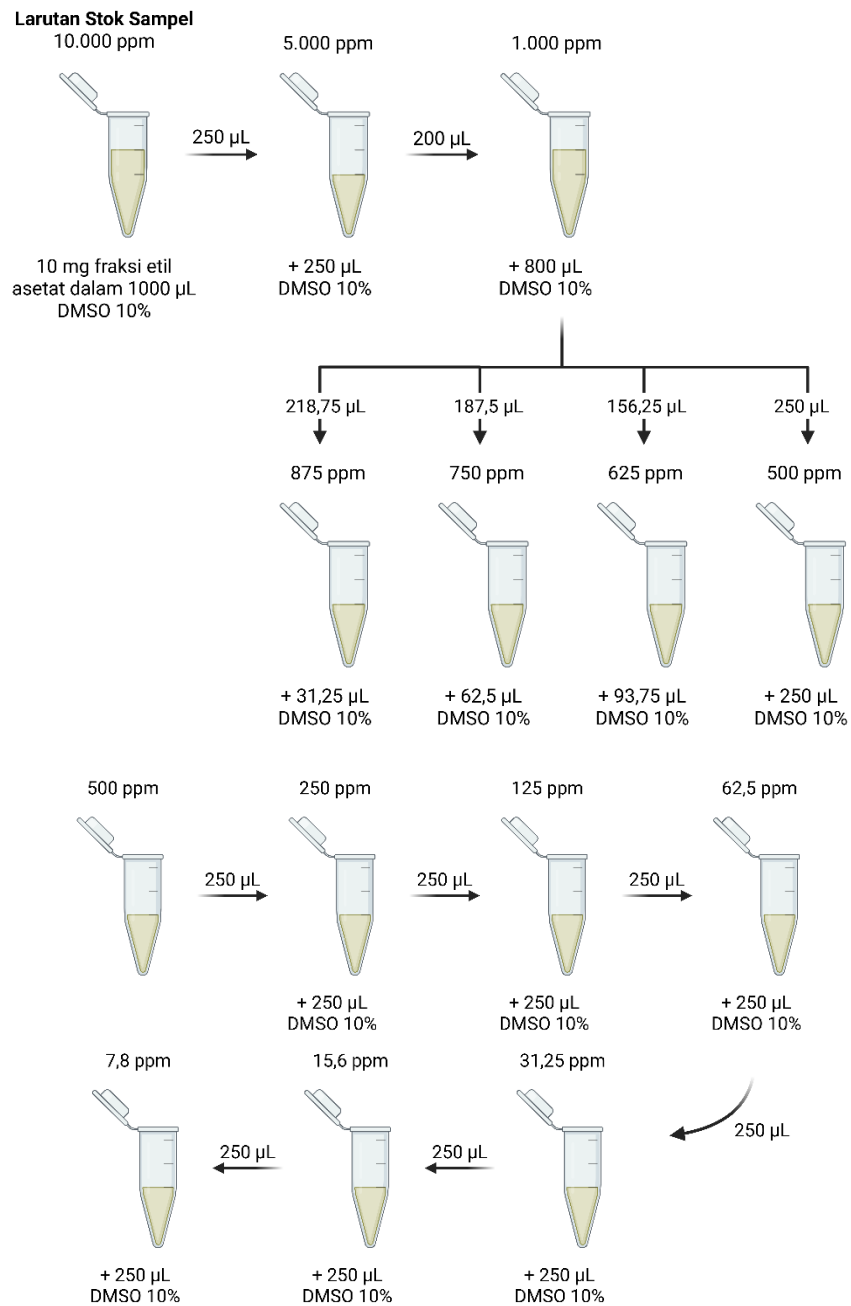
Gambar 3.2. Pembuatan Larutan Kurva Baku Hematin.

Larutan stok sampel fraksi etil asetat 10.000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 10 mg fraksi etil asetat daun legundi dalam 100 μL DMSO 100% dan ditambahkan 900 μL akuades. Larutan fraksi etil asetat 5.000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 250 μL larutan stok fraksi etil asetat 10.000 ppm dalam 250 μL larutan DMSO 10%. Larutan fraksi etil asetat 1.000 ppm dibuat dengan cara

melarutkan 200 μL larutan fraksi etil asetat 5.000 ppm dalam 800 μL larutan DMSO 10%. Larutan fraksi etil asetat 875; 750; 625; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 dan 7,8 ppm dibuat masing-masing sebanyak 500 μL menggunakan pengenceran bertingkat seperti yang tertera pada **Gambar 3.3**.

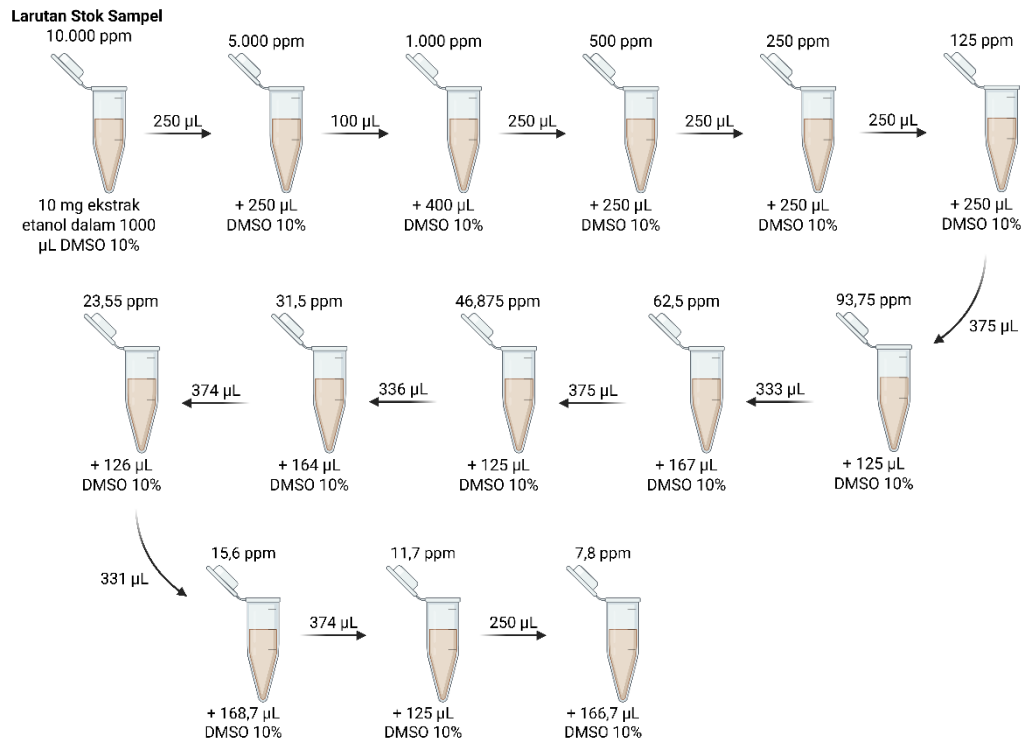
Larutan stok sampel ekstrak etanol 10.000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 10 mg ekstrak etanol daun legundi dalam 100 μL DMSO 100% dan ditambahkan 900 μL akuades. Larutan ekstrak etanol 5.000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 250 μL larutan stok ekstrak etanol 10.000 ppm dalam 250 μL larutan DMSO 10%. Larutan ekstrak etanol 1.000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 100 μL larutan ekstrak etanol 5.000 ppm dalam 400 μL larutan DMSO 10%. Larutan ekstrak etanol 1.000; 500; 250; 125; 93,75; 62,5; 46,875; 31,5; 23,5; 15,6; 11,7 dan 7,8 ppm dibuat masing-masing sebanyak 500 μL menggunakan pengenceran bertingkat seperti yang tertera pada **Gambar 3.4**.

Larutan uji fraksi etil asetat dengan konsentrasi 1.000; 875; 750; 625; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; dan 7,8 ppm dibuat menggunakan larutan sampel fraksi etil asetat yang telah dibuat sebelumnya. Larutan uji konsentrasi 1.000 ppm dibuat dengan menambahkan 100 μL larutan hematin 1.000 μM pada *microtube* kosong, diikuti dengan penambahan 50 μL larutan fraksi etil asetat 1.000 ppm, dan 50 μL asam asetat glasial secara berurutan. Sementara itu, larutan uji ekstrak etanol dibuat dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 93,75; 62,5; 46,875; 31,5; 23,5; 15,6; 11,7; dan 7,8 ppm. Larutan DMSO 10% dan NaOH 0,2 M digunakan sebagai kontrol negatif. Larutan kontrol negatif NaOH 0,2 M dibuat dengan cara menambahkan 50 μL NaOH 0,2 M ke dalam *microtube*, dilanjutkan dengan penambahan 100 μL larutan hematin 1.000 μM dan 50 μL asam asetat glasial secara berurutan. Prosedur pembuatan larutan uji fraksi etil asetat, larutan uji ekstrak etanol, serta larutan kontrol negatif dilakukan dengan metode yang serupa, sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 3.5**.

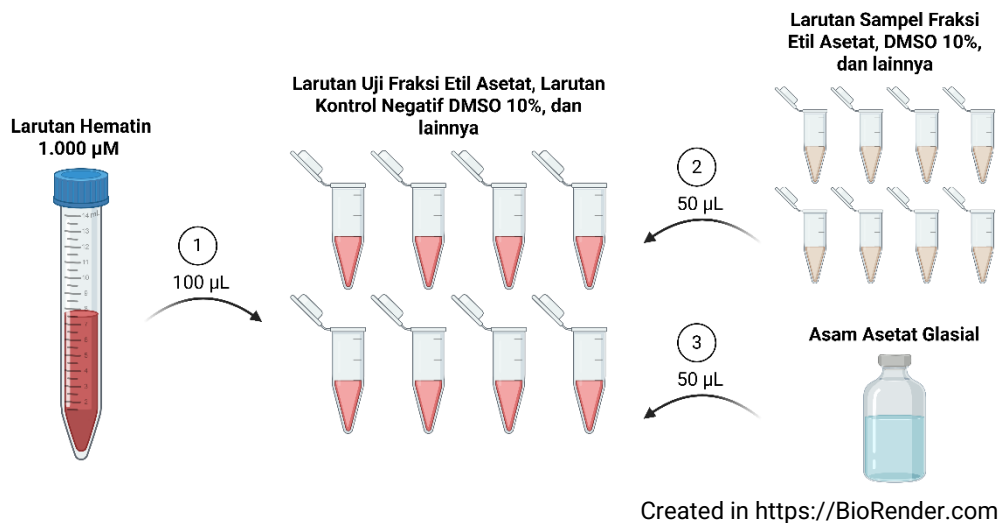


Created in <https://BioRender.com>

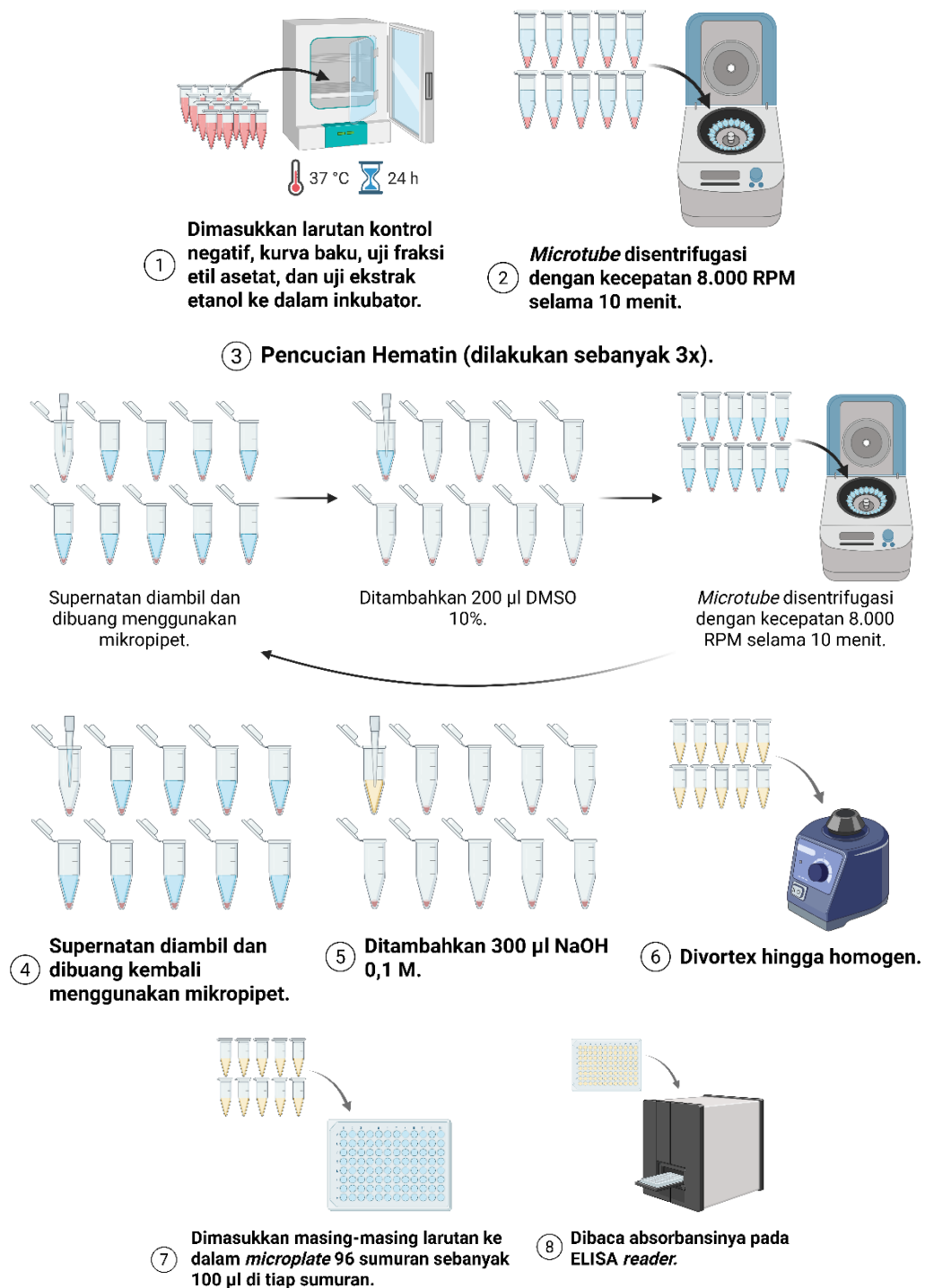
Gambar 3.3. Pembuatan Larutan Sampel Fraksi Etil Asetat.



Gambar 3.4. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol.



Gambar 3.5. Pembuatan Larutan Uji dan Larutan Kontrol Negatif.



Gambar 3.6. Prosedur Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.

Larutan kontrol negatif, kurva baku, dan larutan uji fraksi etil asetat maupun ekstrak etanol yang telah dibuat dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, prosedur pengujian dilakukan seperti pada **Gambar 3.6**. *Mapping* untuk *microplate* 96 sumuran dibuat agar isi dari masing-masing sumuran dapat terdokumentasi dengan jelas seperti pada **Lampiran**

3. Serapan dari masing-masing larutan diukur menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm, dan nilai absorbansi yang diperoleh disimpan untuk kemudian diolah menggunakan Microsoft Excel dan SPSS (*Statistical Program Software System*) versi 25.0.

3.4 Analisis Hasil

3.4.1 Analisis Kualitatif

Data kualitatif yang diperoleh dalam penelitian ini adalah hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), yaitu perubahan warna pada bercak di plat KLT. Pereaksi semprot yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada **Tabel 3.1**. Keberadaan alkaloid ditandai dengan adanya warna jingga kecoklatan pada silika gel yang dilihat pada sinar tampak (Wagner dkk., 1984). Keberadaan flavonoid ditandai dengan adanya warna kuning, hijau, atau biru pada plat silika gel yang telah disemprot AlCl_3 dilihat dengan sinar UV 366 (Natasa dkk., 2021). Keberadaan senyawa fenol ditandai dengan adanya warna hitam atau biru kehitaman pada plat silika gel yang telah disemprot FeCl_3 dilihat pada sinar tampak (Indrayudha & Cahyani, 2020; Suhaenah & Nuryanti, 2017). Keberadaan terpenoid ditandai dengan adanya warna ungu pada silika gel yang telah disemprot vanillin-asam sulfat dilihat secara visibel (Indrayudha & Cahyani, 2020). Keberadaan triterpenoid-steroid ditandai dengan adanya warna kekuningan pada plat yang telah disemprot Liebermann-Burchard dilihat pada sinar tampak maupun sinar UV (Oleszek dkk., 2008). Keberadaan steroid-saponin ditandai dengan adanya warna biru atau hijau pada plat yang telah disemprot Liebermann-Burchard dilihat pada sinar UV 366 (Farnsworth, 1966). Menurut Widyaningrum & Ningrum (2021), keberadaan saponin dapat ditandai dengan adanya warna merah pada plat yang telah disemprot Liebermann-Burchard.

Tabel 3.1. Pereaksi Semprot dan Metabolit Sekunder yang Diidentifikasi.

Pereaksi Semprot	Metabolit Sekunder	Warna Bercak
Dragendorff	Alkaloid	Jingga kecoklatan
AlCl ₃	Flavonoid	Kuning, hijau atau biru
FeCl ₃	Fenol	Hitam atau biru kehitaman
Vanillin-asam sulfat	Terpenoid	Ungu
	Saponin	Merah, biru atau hijau
Liebermann-Burchard	Steroid	Kuning samar, biru atau hijau
	Triterpenoid	Kuning samar

Referensi: Farnsworth, 1966; Indrayudha & Cahyani, 2020; Natasa dkk., 2021; Oleszek dkk., 2008; Suhaenah & Nuryanti, 2017; Wagner dkk., 1984; Widyaningrum & Ningrum, 2021

3.4.2 Analisis Kuantitatif

Data kuantitatif yang diperoleh dalam penelitian ini adalah hasil rendemen ekstrak, nilai Rf masing-masing metabolit sekunder, persentase penghambatan polimerisasi hem, dan konsentrasi hambat 50% (IC₅₀). Nilai Rf diperoleh dari jarak yang ditempuh bercak dan pelarut pada plat KLT. Untuk menentukan nilai IC₅₀, digunakan metode analisis probit. Analisis tersebut dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Program Software System*) versi 25.0 (Arnida dkk., 2021). Nilai IC₅₀ sampel selanjutnya akan dibandingkan dengan nilai IC₅₀ klorokuin fosfat untuk melihat mengevaluasi potensi sampel dalam menghambat polimerisasi hem (Ghani dkk., 2024). Berdasarkan sejumlah penelitian sebelumnya, nilai IC₅₀ klorokuin yang digunakan sebagai pembanding dapat diacu dari data yang dilaporkan dalam studi lain (Arnida dkk., 2020, 2021; Ghani dkk., 2024). Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Baelmans dkk. (2000), nilai IC₅₀ untuk klorokuin sulfat tercatat sebesar 37,5 µM atau setara dengan 11,99 µg/mL. Sementara itu, hasil penelitian terbaru oleh Ghani dkk. (2024) melaporkan nilai IC₅₀ klorokuin sulfat sebesar 37,50 ± 0,60 µM atau 11,99 ± 0,19 µg/mL. Selain itu, *software* lain yang digunakan adalah Microsoft Excel untuk melakukan analisis regresi linear sederhana ($y = bx + a$) dan uji koefisien determinasi (R²).

3.4.2.1. Rumus rendemen ekstrak

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100$$

3.4.2.2. Rumus rendemen fraksi

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot fraksi yang diperoleh}}{\text{Bobot ekstrak yang difraksinasi}} \times 100$$

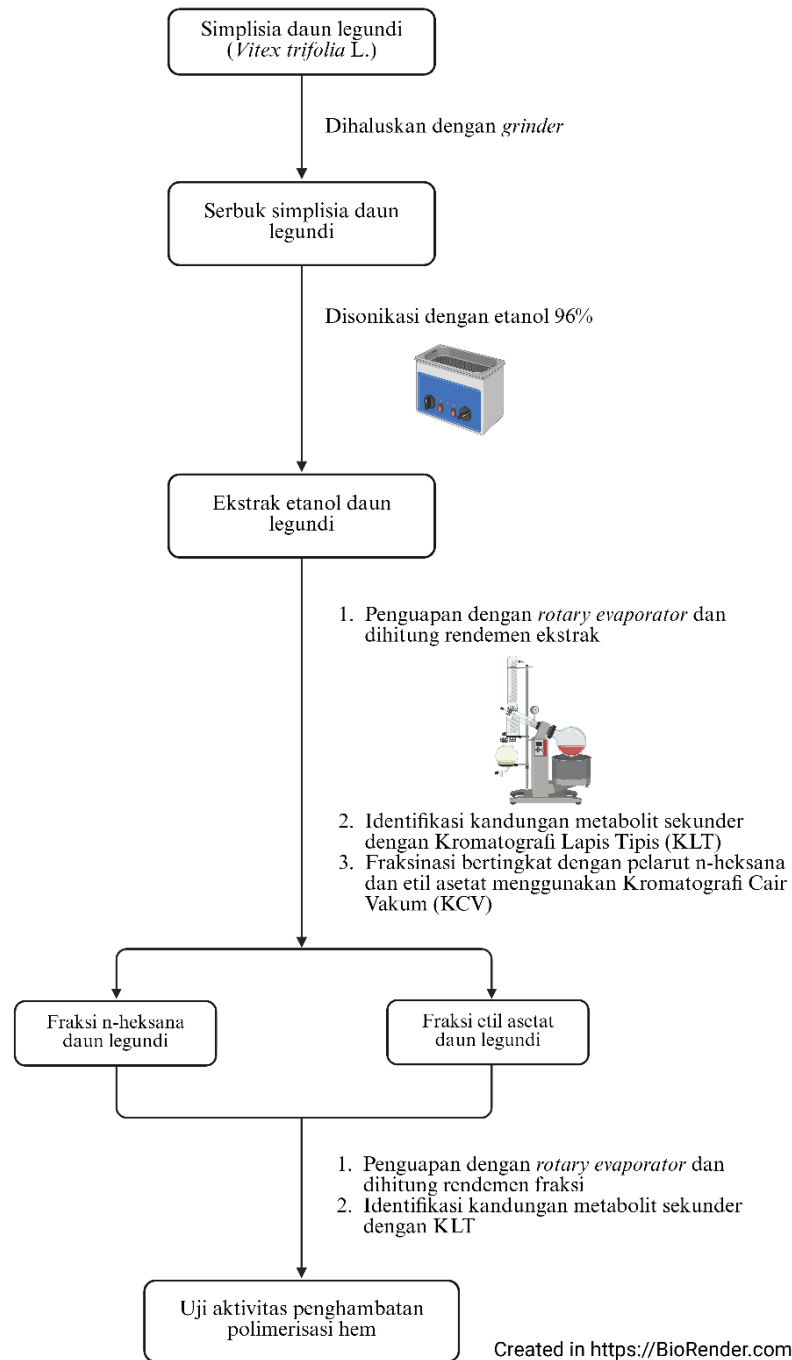
3.4.2.3. Rumus R_f

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh bercak (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

3.4.2.4. Rumus persentase penghambatan polimerisasi hem (Arnida dkk., 2021).

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{(\beta\text{-hematin kontrol DMSO 10\%}) - (\beta\text{-hematin sampel})}{\beta\text{-hematin kontrol DMSO 10\%}} \times 100$$

3.5 Alur Penelitian



Gambar 3.7. Skema Penelitian.

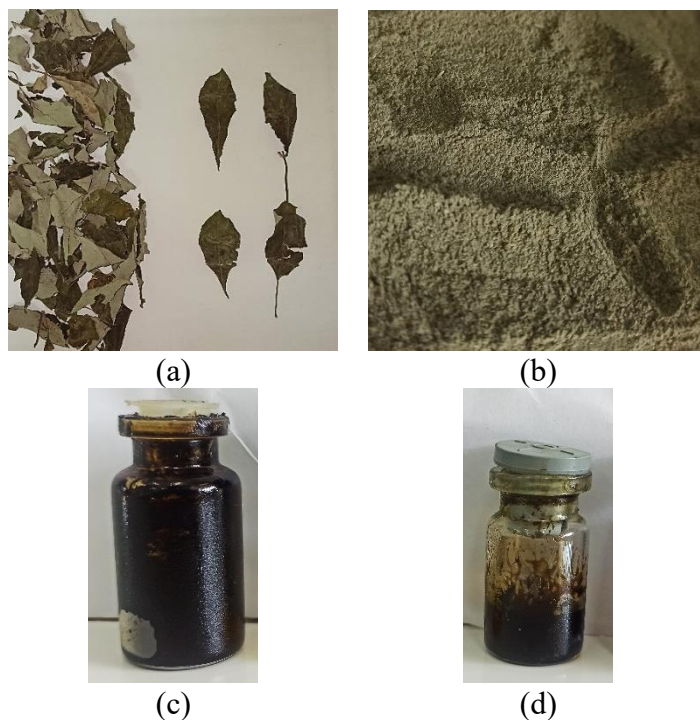
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dan aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari fraksi etil asetat daun legundi. Prosedur penelitian ini dimulai dengan pembuatan ekstrak etanol, dilanjutkan dengan fraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat, kemudian identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Ekstraksi dilakukan dengan metode sonikasi, sedangkan fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum (KCV). Simplisia kering daun legundi dideterminasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu dengan nomor surat hasil determinasi TL.02.04/D.XI.6/24934.1172/2024 dan terlampir pada **Lampiran 1**.

4.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Simplisia Daun Legundi

Simplisia daun legundi diperiksa kadar airnya sebanyak 3 replikasi dan diperoleh nilai sebesar $6,083 \pm 0,0929\%$. Nilai ini telah memenuhi kadar yang disyaratkan untuk menjaga kestabilan dan mutu simplisia maksimum sebesar $\leq 10\%$ (Wijaya & Noviana, 2022). Sementara itu, hasil pemeriksaan kadar air dari serbuk daun legundi sebesar $6,02 \pm 0,0755\%$. Serbuk diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%. Etanol dipilih sebagai pelarut untuk ekstraksi karena bersifat universal, sehingga dapat menarik senyawa polar hingga non polar (Nurliansyah dkk., 2024). Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Setelah dilakukan ekstraksi, diperoleh hasil ekstrak berwarna hijau tua dengan total bobot ekstrak sebesar 70,2 gram dan rata-rata rendemen sebesar 17,87%. Nilai rendemen ekstrak etanol daun legundi ini telah memenuhi syarat nilai rendemen ekstrak kental daun legundi yang disebutkan dalam Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, yaitu tidak kurang dari 12,1% (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Dokumentasi visual ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1. Dokumentasi Visual Simplisia, Serbuk, Ekstrak Etanol, dan Fraksi Etil Asetat Daun Legundi.

Keterangan: (a) Simplisia, (b) Serbuk, (c) Ekstrak etanol, (d) Fraksi etil asetat daun legundi.

Ekstrak etanol daun legundi difraksinasi secara bertingkat menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan pelarut n-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak. Pemilihan kedua pelarut ini sebagai fase gerak bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritas senyawa tersebut (Nurani dkk., 2024). Fase diam yang digunakan pada kolom kromatografi adalah silika gel 60 G. Setelah dilakukan fraksinasi, diperoleh hasil fraksi etil asetat berwarna hijau tua dengan total bobot fraksi sebesar 20,39 gram dan rata-rata nilai rendemen sebesar 31,86%.

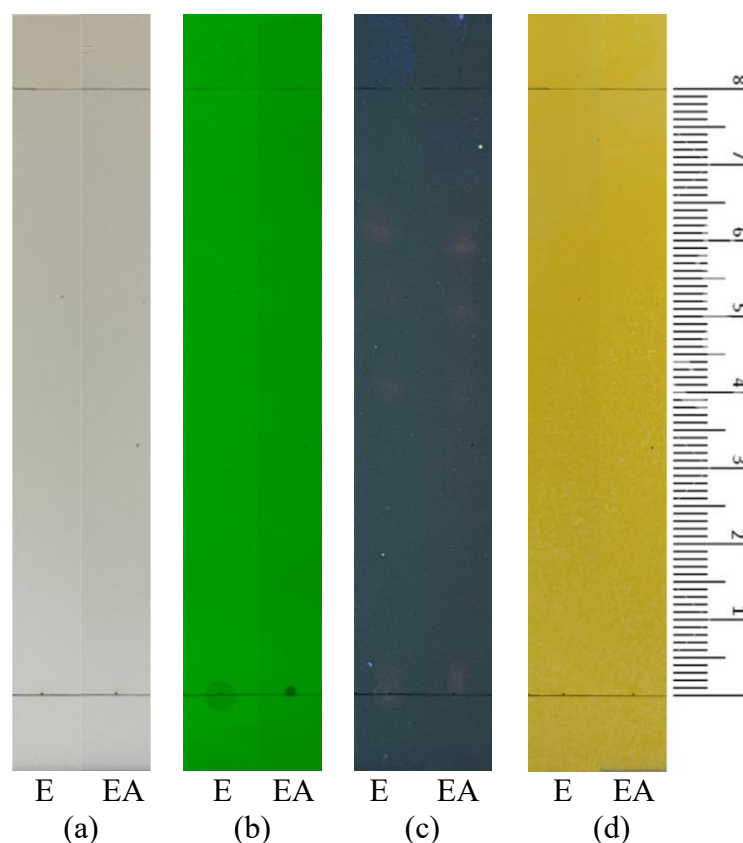
4.2 Hasil Identifikasi Metabolit Sekunder

Identifikasi metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi. Metabolit sekunder yang diidentifikasi adalah alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, triterpenoid, saponin, dan steroid. Metode Kromatografi lapis tipis (KLT) dipilih karena sederhana dan mudah untuk dilakukan. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah silika gel 60 F₂₅₄, yang merupakan adsorben polar dan bersifat asam lemah. Silika gel banyak digunakan karena bersifat ekonomis, tidak larut dalam fase gerak, dan tidak berinteraksi dengan fase gerak

yang digunakan. Sifat asam lemah dari silika gel membuatnya dapat digunakan untuk membedakan steroid, asam amino, alkaloid, dan lainnya (Rosamah, 2019).

Permukaan silika gel mengandung gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan berbagai senyawa. Semakin kuat ikatan hidrogen, semakin lama senyawa tertahan pada silika gel. Senyawa polar cenderung diserap kuat pada silika gel. Senyawa non polar, yang tidak memiliki gugus fungsi polar, menjadikannya diserap dengan lemah. Solusinya, pelarut non polar dapat digunakan untuk mengelusi senyawa non polar (Sarker dkk., 2006).

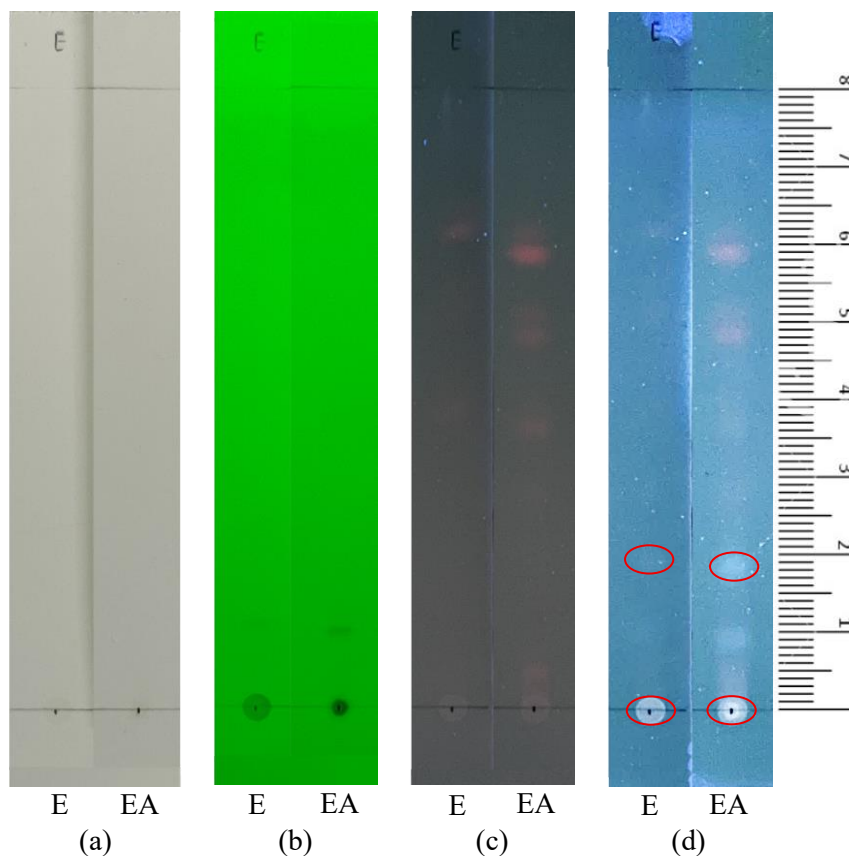
Fase gerak yang digunakan untuk identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, triterpenoid, saponin, dan steroid adalah campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 2:1, sebagaimana direkomendasikan dalam Farmakope Herbal Indonesia Edisi II (2017). Sementara itu, untuk identifikasi senyawa terpenoid digunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4:1. Pemilihan rasio ini didasarkan pada karakteristik terpenoid yang tersusun dari unit isoprena (C_5H_8) dan cenderung non polar, sehingga fase gerak ini diharapkan dapat mengelusi lebih banyak senyawa non polar (Nurani dkk., 2024). Hal ini akan mempermudah visualisasi bercak senyawa setelah penyemprotan dengan vanillin-asam sulfat.



Gambar 4.2. Identifikasi Alkaloid.

Keterangan: E = Ekstrak Etanol, EA = Fraksi Etil Asetat. Plat hasil elusi pada sinar (a) tampak, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) tampak setelah disemprot Dragendorff. Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1). Fase diam: silika gel 60 G.

Identifikasi alkaloid dilakukan menggunakan pereaksi semprot Dragendorff. Setelah disemprot, kromatogram diamati di bawah sinar tampak. Hasil uji identifikasi kandungan senyawa ini dapat dilihat pada **Gambar 4.1**. Dragendorff dapat mendeteksi senyawa nitrogen yang terdapat dalam alkaloid. Atom nitrogen tersebut akan membentuk ikatan kovalen dengan ion logam K^+ dan membentuk ion kompleks tetraiodobismutat(III) (Wahyuni & Marpaung, 2020; Wigati & Rahardian, 2018). Keberadaan alkaloid ditandai dengan adanya bercak berwarna jingga setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff (Suhaenah & Nuryanti, 2017). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak terdapat bercak pada ekstrak etanol maupun fraksi etil asetat. Oleh karena itu, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol dan fraksi etil asetat legundi tidak mengandung alkaloid.

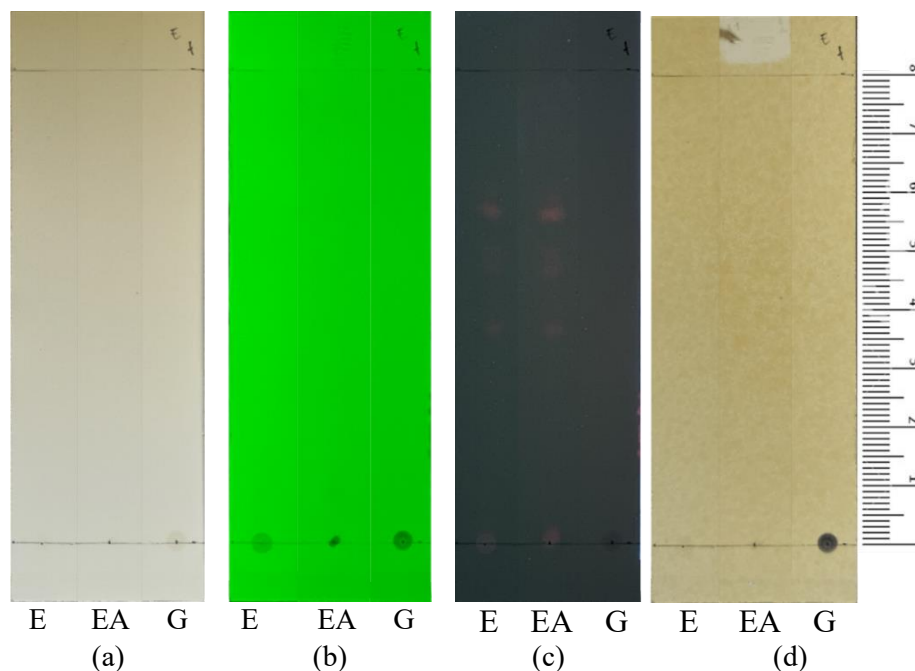


Gambar 4.3. Identifikasi Flavonoid.

Keterangan: E = Ekstrak Etanol, EA = Fraksi Etil Asetat. Plat hasil elusi pada sinar (a) tampak, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) UV 366 nm setelah disemprot AlCl_3 . Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1). Fase diam: silika gel 60 G.

Identifikasi flavonoid dilakukan menggunakan pereaksi semprot aluminium klorida (AlCl_3). Setelah disemprot dengan AlCl_3 , plat dipanaskan pada *hot plate* dengan suhu 100°C , lalu kromatogram diamati di bawah sinar ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 366 nm. Hasil uji identifikasi kandungan senyawa ini dapat dilihat pada **Gambar 4.2**. AlCl_3 dapat bereaksi dengan flavonoid membentuk kompleks yang berwarna kuning, di mana ion Al^{3+} berikatan dengan tiga gugus O^- dari gugus hidroksil flavonoid, membentuk struktur kompleks yang stabil dan menyebabkan perubahan warna menjadi kuning setelah disemprot dengan pereaksi AlCl_3 (Beda, 2018). Keberadaan flavonoid ditandai dengan adanya bercak berwarna kuning atau biru (Natasa dkk., 2021). Hasil pengamatan menunjukkan adanya bercak berwarna kuning dengan nilai R_f 0 pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat. Selain itu, terdapat bercak berwarna biru dengan nilai R_f 0,78 dan 0,23 pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat. Munculnya bercak berwarna kuning dan biru pada plat yang telah disemprot AlCl_3 di bawah sinar UV 366 mengindikasikan

keberadaan senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi (Natasa dkk., 2021). Bercak biru pada fraksi etil asetat diduga adalah senyawa katekin. Karena menurut Farnsworth (1966), bercak senyawa katekin tidak berwarna pada sinar tampak dan UV sebelum disemprot dan berwarna biru setelah disemprot aluminium klorida.

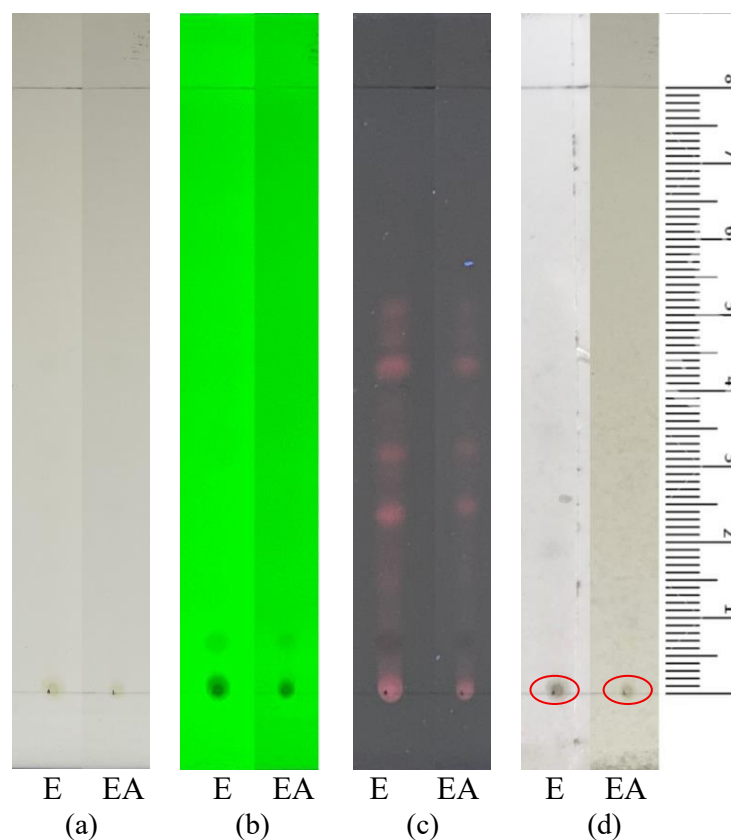


Gambar 4.4. Identifikasi Fenol.

Keterangan: E = Ekstrak Etanol, EA = Fraksi Etil Asetat, G = Standar Asam Galat. Plat hasil elusi pada sinar (a) tampak, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) tampak setelah disemprot FeCl_3 . Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1). Fase diam: silika gel 60 G.

Identifikasi fenol dilakukan menggunakan pereaksi semprot besi(III) klorida (FeCl_3). Setelah disemprot dengan FeCl_3 , plat dipanaskan pada *hot plate* dengan suhu 100°C , lalu kromatogram diamati di bawah sinar tampak atau visibel. Pada identifikasi ini, asam galat digunakan sebagai standar. Hasil uji identifikasi kandungan senyawa ini dapat dilihat pada **Gambar 4.3**. FeCl_3 dapat bereaksi dengan gugus fenol dalam sampel dan tereduksi menjadi Fe^{2+} sehingga membentuk warna biru kehitaman (Sayakti dkk., 2022). Keberadaan fenol ditandai dengan adanya bercak berwarna gelap (hitam, ungu, biru tua atau coklat (Suhaenah & Nuryanti, 2017). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terdapat warna biru kehitaman pada totolan standar asam galat, namun tidak ada bercak yang muncul pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi. Bercak berwarna biru kehitaman pada plat yang telah disemprot FeCl_3 di bawah sinar tampak

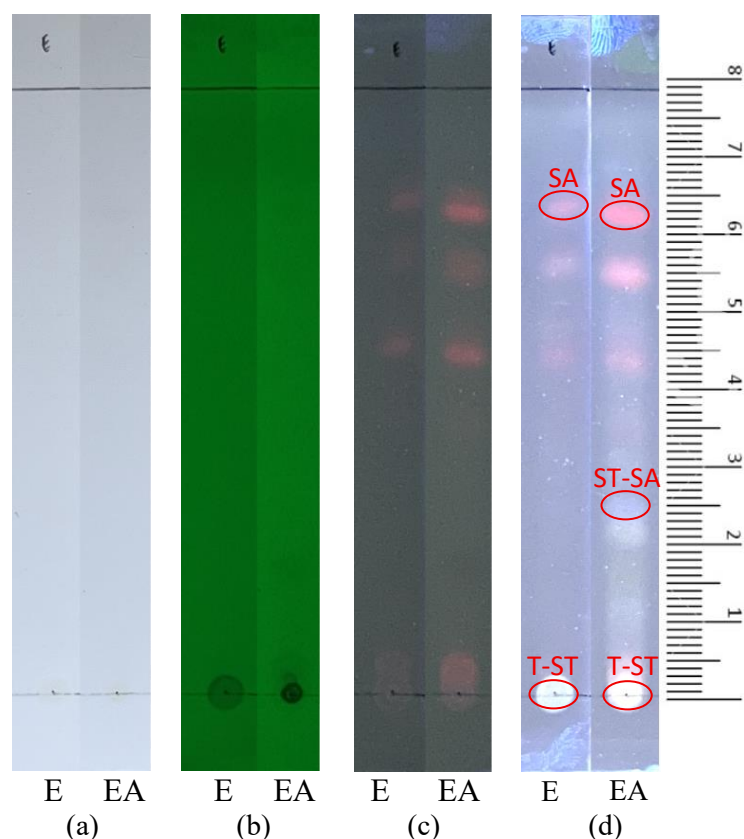
mengindikasikan keberadaan senyawa fenol dalam sampel (Suhaenah & Nuryanti, 2017).



Gambar 4.5. Identifikasi Terpenoid.

Keterangan: E = Ekstrak Etanol, EA = Fraksi Etil Asetat. Plat hasil elusi pada sinar (a) tampak, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) tampak setelah disemprot vanillin-asam sulfat dan dipanaskan. Fase gerak: n-heksana:etil asetat (4:1). Fase diam: silika gel 60 G.

Identifikasi terpenoid dilakukan menggunakan pereaksi semprot vanillin-asam sulfat. Setelah disemprot, plat dipanaskan pada *hot plate* dengan suhu 100°C, lalu kromatogram diamati di bawah sinar tampak (Sarker dkk., 2006). Hasil uji identifikasi kandungan senyawa ini dapat dilihat pada **Gambar 4.4**. Vanillin-asam sulfat dapat digunakan untuk identifikasi keberadaan terpenoid. Hal ini ditandai dengan adanya bercak berwarna ungu (Indrayudha & Cahyani, 2020). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terdapat bercak berwarna ungu kehitaman yang muncul pada plat yang telah disemprot dan diamati di bawah sinar tampak. Menurut Indrayudha & Cahyani (2020), bercak berwarna ungu yang muncul pada plat yang telah disemprot vanillin-asam sulfat mengindikasikan keberadaan senyawa terpenoid dalam sampel.



Gambar 4.6. Identifikasi Triterpenoid, Saponin, dan Steroid.

Keterangan: E = Ekstrak Etanol, EA = Fraksi Etil Asetat. Plat hasil elusi pada sinar (a) tampak, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) tampak setelah disemprot Liebermann-Burchard. SA = Saponin, ST-SA = Steroid-saponin, T-ST = Triterpenoid-steroid. Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1). Fase diam: silika gel 60 G.

Identifikasi senyawa metabolit sekunder golongan triterpenoid, saponin, dan steroid dilakukan menggunakan pereaksi semprot Liebermann-Burchard. Setelah disemprot, plat dipanaskan pada *hot plate* dengan suhu 100°C, lalu kromatogram diamati di bawah sinar ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 366 nm. Hasil uji identifikasi kandungan senyawa ini dapat dilihat pada **Gambar 4.5**. Liebermann-Burchard dapat bereaksi dengan gugus OH yang terdapat dalam senyawa triterpenoid atau steroid dan membentuk senyawa ester (Setyawaty dkk., 2020). Keberadaan triterpenoid-steroid ditandai dengan adanya bercak berwarna kuning pada plat yang telah disemprot Liebermann-Burchard pada sinar tampak maupun UV (Oleszek dkk., 2008). Sementara itu, keberadaan saponin ditandai dengan adanya bercak berwarna merah pada plat yang telah disemprot Liebermann-Burchard (Widyaningrum & Ningrum, 2021). Menurut Farnsworth (1966), keberadaan steroid-saponin ditandai dengan adanya bercak berwarna biru atau biru kehijauan.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat terdapat warna kuning ringan yang mengindikasikan adanya triterpenoid-steroid dan warna merah muda yang mengindikasikan adanya saponin (Oleszek dkk., 2008; Widyaningrum & Ningrum, 2021). Selain itu, pada fraksi etil asetat, terdapat bercak biru yang mengindikasikan adanya steroid-saponin (Farnsworth, 1966). Dengan demikian, kedua sampel diketahui sama-sama mengandung triterpenoid, saponin, dan steroid. Ekstrak etanol Seluruh hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun legundi dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1. Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun Legundi.

Pereaksi Semprot	Senyawa yang Diidentifikasi	Warna Bercak	Ekstrak Etanol	Fraksi Etil Asetat
Dragendorff	Alkaloid	-	-	-
AlCl ₃	Flavonoid	Biru	+	+
FeCl ₃	Fenol	-	-	-
Vanillin-asam sulfat	Terpenoid	Ungu-kehitaman	+	+
	Saponin	Merah muda	+	+
Liebermann-Burchard	Steroid	Kuning samar, biru	+	+
	Triterpenoid	Kuning samar	+	+

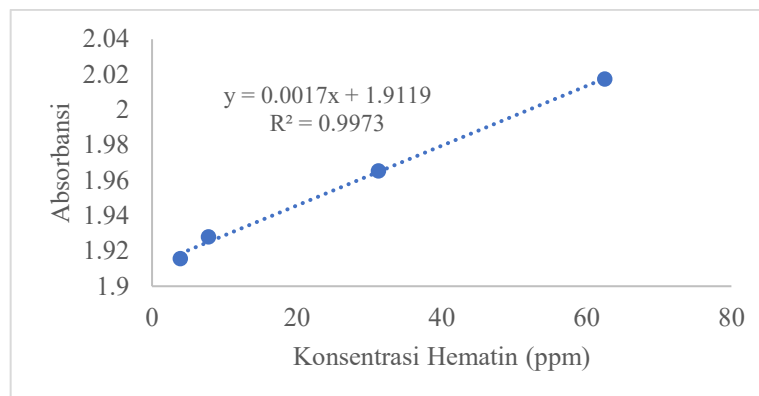
Referensi: Farnsworth, 1966; Indrayudha & Cahyani, 2020; Natasa dkk., 2021; Oleszek dkk., 2008; Widyaningrum & Ningrum, 2021

Dalam penelitian ini, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, terpenoid, triterpenoid, saponin, dan steroid. Senyawa serupa juga teridentifikasi pada fraksi etil asetat. Data pengamatan berupa warna bercak serta nilai Rf masing-masing senyawa tercantum pada **Lampiran 2**. Terdapat beberapa perbedaan hasil antara penelitian ini dan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Indrayudha & Cahyani (2020). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa terdapat senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol daun legundi dan senyawa fenol dalam fraksi etil asetat daun legundi. Sementara itu, kedua senyawa tersebut tidak ditemukan dalam penelitian ini. Selain itu, hasil identifikasi pada penelitian ini menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat daun legundi, sedangkan senyawa ini tidak ditemukan dalam penelitian sebelumnya (Indrayudha & Cahyani, 2020).

Perbedaan kandungan metabolit sekunder tersebut dapat disebabkan oleh banyak hal seperti perbedaan kualitas daun, ketersediaan unsur hara, kondisi geografi dan demografis (Pratama & Mahmudah, 2024). Selain itu, perbedaan faktor lingkungan, metode identifikasi (seperti fase gerak dan fase diam), metode ekstraksi dan fraksinasi juga memengaruhi perbedaan senyawa yang terkandung dalam sampel. Faktor lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan intensitas cahaya dapat memengaruhi biosintesis metabolit sekunder pada tanaman. Metode ekstraksi yang digunakan, seperti perbedaan waktu dan suhu ekstraksi dapat memengaruhi jenis dan konsentrasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Demikian pula, teknik fraksinasi yang berbeda dapat menghasilkan profil metabolit yang berbeda.

4.3 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Legundi Terhadap Penghambatan Polimerisasi Hem

Dalam pengujian yang telah dilakukan, kurva baku dibuat untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi hematin dan absorbansinya (Zakiah dkk., 2021). Dari nilai absorbansi kurva baku, dilakukan analisis regresi linear sederhana ($y = bx + a$) dan uji koefisien determinasi (R^2) untuk mengetahui hubungan konsentrasi hematin dan absorbansinya. Hasil analisis regresi linear dapat dilihat pada **Gambar 4.6** dengan data yang lebih rinci tersedia pada **Lampiran 4**. Data ini selanjutnya akan digunakan untuk menghitung persentase penghambatan polimerisasi hem. Untuk memperoleh model regresi yang mencerminkan kondisi sebenarnya, nilai koefisien determinasi diusahakan mendekati satu (Muniroh dkk., 2024). Menurut SNI 6989.2:2009 (2009), nilai minimum yang dapat diterima untuk koefisien korelasi regresi linear (r) atau koefisien determinasi (R^2) sebesar $\geq 0,995$. Berdasarkan hasil analisis, nilai regresi linear yang diperoleh dalam penelitian ini telah memenuhi standar tersebut, sehingga hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dapat dikatakan kuat dan valid.



Gambar 4.7. Grafik Kurva Baku Hematin.

Hasil uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem dapat dinyatakan dalam nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}), yaitu konsentrasi yang dapat menghambat polimerisasi hingga 50% dari total (Arnida dkk., 2021). Data hasil uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem daun legundi terdapat pada **Tabel 4.2.** dengan data yang lebih rinci tersedia pada **Lampiran 5.** Sementara itu, hasil analisis statistik probit tersedia pada **Lampiran 6.** Suatu sampel dapat dikatakan memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem jika memiliki nilai IC_{50} kurang atau sama dengan klorokuin (Ghani dkk., 2024). Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Baelmans dkk. (2000), nilai IC_{50} untuk klorokuin sulfat tercatat sebesar $37,50 \mu\text{M}$ atau setara dengan $11,99 \mu\text{g/mL}$. Sementara itu, hasil penelitian terbaru oleh Ghani dkk. (2024) melaporkan nilai IC_{50} klorokuin sulfat sebesar $37,50 \pm 0,60 \mu\text{M}$ atau $11,99 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan data pada **Tabel 4.2.**, baik fraksi etil asetat maupun ekstrak etanol daun legundi menunjukkan tidak adanya aktivitas penghambatan polimerisasi hem.

Tabel 4.2. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Fraksi Etil Asetat dan Ekstrak Etanol Daun Legundi.

Sampel	IC_{50} (Rata-rata \pm SD)
Fraksi Etil Asetat	$189,69 \pm 16,59$
Ekstrak Etanol	$13,85 \pm 1,14$

Nilai IC_{50} ekstrak etanol lebih rendah dibandingkan fraksi etil asetat, yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem yang relatif lebih baik. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan konsentrasi dan jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam kedua sampel.

Ekstrak etanol mengandung metabolit sekunder yang lebih banyak dan lebih beragam, sementara fraksi etil asetat terdiri dari senyawa yang telah terfraksinasi sehingga jumlah dan jenisnya lebih terbatas. Nilai IC_{50} fraksi etil asetat yang lebih tinggi juga menunjukkan bahwa senyawa-senyawa semipolar yang ditarik oleh etil asetat kemungkinan tidak berperan aktif dalam mekanisme penghambatan polimerisasi hem.

Etanol memiliki sifat universal, yang berarti dapat menarik senyawa polar hingga non polar. Hal ini disebabkan oleh adanya dua gugus fungsional dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu gugus hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat non polar (Nurliansyah dkk., 2024; Pangisian dkk., 2022). Sementara itu, etil asetat dapat menarik senyawa maupun non polar (Putri & Warditiani, 2013). Pada penelitian ini, proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Akibatnya, senyawa non polar dalam ekstrak etanol telah terpisahkan terlebih dahulu oleh pelarut n-heksana, sehingga diduga hanya senyawa semipolar yang ditarik oleh etil asetat. Dengan demikian, fraksi etil asetat dalam penelitian ini diperkirakan mengandung senyawa semipolar, sementara senyawa non polar sebagian besar telah terpisahkan selama proses fraksinasi dengan pelarut n-heksana.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, salah satunya terkait penggunaan pelarut DMSO 10% yang memiliki keterbatasan dalam melarutkan fraksi etil asetat daun legundi. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan polaritas antara sampel dan pelarut. Kondisi ini berpotensi menyebabkan sejumlah senyawa aktif tidak larut sepenuhnya. Akibatnya, kemampuan aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari fraksi etil asetat menjadi tidak tercermin secara maksimal dalam hasil uji yang diperoleh.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa baik ekstrak etanol maupun fraksi etil asetat daun legundi tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Meskipun ekstrak etanol memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah daripada fraksi etil asetat, nilainya masih lebih tinggi dari IC_{50} klorokuin sebagai standar, sehingga belum dapat dikatakan memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Perbedaan nilai IC_{50} antara kedua sampel diduga disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi dan jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam kedua sampel.

Selain itu, terbatasnya kemampuan fraksi etil asetat dalam merepresentasikan potensi aktivitas penghambatan polimerisasi hem secara optimal juga diduga berkontribusi terhadap tingginya nilai IC_{50} yang diperoleh.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol daun legundi mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, terpenoid, triterpenoid, saponin, dan steroid. Fraksi etil asetat juga mengandung metabolit sekunder serupa.
2. Ekstrak etanol daun legundi memiliki aktivitas yang lebih baik dibanding fraksi etil asetat dalam menghambat polimerisasi hem.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut lain yang kepolarannya mendekati DMSO 10% agar fraksi dapat larut dan menunjukkan seluruh potensinya dalam aktivitas penghambatan polimerisasi hem.
2. Perlu dilakukan identifikasi senyawa spesifik pada ekstrak etanol maupun fraksi etil asetat untuk mengetahui aktivitas yang berpotensi dimiliki oleh kedua sampel ini.
3. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap sel *Plasmodium falciparum* untuk mengevaluasi secara langsung kemampuan fraksi etil asetat maupun ekstrak etanol dalam membunuh sel parasit.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, R., Oktaviantari, D. E., & Feladita, N. 2021. Identifikasi Hidrokuinon Dalam Sabun Pemutih Pembersih Wajah Di Tiga Klinik Kecantikan Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Analisis Farmasi*, 6(1), p. 95–101.
- Alam, G., Wahyuono, S., Ganjar, I. G., Hakim, L., Timmerman, H., & Verpoorte, R. 2002. Tracheospasmodic Activity of Viteosin-A and Vitexicarpin Isolated from *Vitex trifolia*. *Planta Medica*, 68(11), p. 1047–1049. <https://doi.org/10.1055/s-2002-35650>
- Arnida, Humairah Z.A, S., Sutomo, & Fadlillahturrahmah. 2021. Heme Polymerization Inhibitory Activity And Phytochemical Screening Of Ethyl Acetate Fraction In Manuran (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K. Heyne) Stem. *Jurnal Jamu Indonesia*, 6(1), p. 1–7. <https://doi.org/10.29244/jji.v6i1.165>
- Arnida, Nurlely, Kartinah, N., & Sutomo. 2020. Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Ekstrak Etanol Daun Cambai Utan (*Piper porphyrophyllum*). *Majalah Farmasetika.*, 4, p. 173–177. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v4i0.25877>
- Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C. M., Nguon, C., Sovannaroeth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., ... White, N. J. 2014. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*, 371(5), p. 411–423. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314981>
- Badan Pusat Statistik. 2024, Mei 26. *Kejadian Malaria Per 1000 Orang, 2019-2021*. Kementerian Kesehatan RI, Profil Kesehatan Indonesia. Tersedia di: <https://www.bps.go.id/id/statistics-table/2/MTM5MyMy/kejadian-malaria-per-1000-orang.html> [Diakses 10 Jan. 2025]
- Badan Standardisasi Indonesia. 2009. *Cara uji Kebutuhan Oksigen Kimiawi (Chemical Oxygen Demand/COD) dengan refluks tertutup secara spektrofotometri*. p. 1–16.
- Baelmans, R., Deharo, E., Muñoz, V., Sauvain, M., & Ginsburg, H. 2000. Experimental Conditions for Testing the Inhibitory Activity of Chloroquine on the Formation of β -Hematin. *Experimental Parasitology*, 96(4), p. 243–248. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4558>
- Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Olliaro, P., & Taramelli, D. 1998. A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1), p. 55–60. <https://doi.org/10.1093/jac/42.1.55>
- Beda, T. O. 2018. *Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Sisik Naga (Drymoglossum piloselloides [L.] Presl) Dengan Metode Kolorimetri AlCl3*. Politeknik Kesehatan Kemenkes Kupang.
- Candani, D., Ulfah, M., Noviana, W., & Zainul, R. 2018. *Pemanfaatan Teknologi Sonikasi*. p. 1–21.
- CDC. 2024. *Malaria Surveillance & Case Investigation Best Practices*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tersedia di:

- <https://www.cdc.gov/malaria/php/surveillance/appendix-a-malaria-lifecycle.html> [Diakses 31 Jan. 2025]
- CDC-DPDx. 2024. *Malaria*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tersedia di: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/> [Diakses 31 Jan. 2025]
- Crespo-Ortiz, M. P., & Wei, M. Q. 2012. Antitumor Activity of Artemisinin and Its Derivatives: From a Well-Known Antimalarial Agent to a Potential Anticancer Drug. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, p. 1–18. <https://doi.org/10.1155/2012/247597>
- Ekasari, W., Basuki, D. R., Arwati, H., & Wahyuni, T. S. 2021. Antiplasmodial activity of Ethanolic extract of *Cassia spectabilis* DC leaf and its inhibition effect in Heme detoxification. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), p. 71. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03239-9>
- Elumalai, K., Velmurugan, S., Ravi, S., Kathiravan, V., & Adaikala Raj, G. 2015. Bio-approach: Plant mediated synthesis of ZnO nanoparticles and their catalytic reduction of methylene blue and antimicrobial activity. *Advanced Powder Technology*, 26(6), p. 1639–1651. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2015.09.008>
- Farnsworth, N. R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3), p. 225–276.
- Felle, Z., & Sahiddin, M. 2024. Unraveling Potential Confounding Variables in the Association Between Maternal Malaria and Child Stunting in Papua: A Case-Control Study with Mantel-Haenszel Analysis. *Public Health of Indonesia*, 10(1), p. 33–42. <https://doi.org/10.36685/phi.v10i1.772>
- Fikadu, M., & Ashenafi, E. 2023. Malaria: An Overview. *Infection and Drug Resistance*, 16, p. 3339–3347. <https://doi.org/10.2147/IDR.S405668>
- Garbi, M. I., Osman, E. E., Kabbashi, A. S., Saleh, M. S., Mohammed, Y. S., ahmed, S. A., Salam, H. A. A., & Priya R, M. 2017. Cytotoxicity of *Vitex trifolia* leaf extracts on MCF-7 and Vero cell lines. *International Research Journal of Natural Sciences*, 5(2), p. 12–21.
- Ghafari, A. T., Jahidin, A. H., Zakaria, Y., & Hasan, H. H. 2022. Anti-Inflammatory Effects Of *Vitex trifolia* Leaves Hydroalcoholic Extract Against Hydrogen Peroxide (H₂O₂)- And Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Raw 264.7 Cells. *Malaysian Applied Biology*, 51(4), p. 185–200. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i4.28>
- Ghani, M. S. A., Bakar, N. A. L. A., Ramadani, A. P., Nugraha, A. T., Awang, K. B., Omar, M. T. C., Supratman, U., Kamarulzaman, E. E., & Mohamad Taib, M. N. A. 2024. Hemisynthesis of Pentacyclic Triterpenoids from *Diospyros foxyworthyi* with In vitro and In silico Anti-malarial Evaluation. *Current Organic Chemistry*, 28(10), p. 799–814. <https://doi.org/10.2174/0113852728294047240315063815>
- Gibbons, S. 2006. An Introduction to Planar Chromatography. Dalam *Natural Products Isolation* (Vol. 20, hlm. 77–116). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:77>
- Handaratri, A., & Yuniati, Y. 2019. Kajian Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei dengan Metode Sonikasi dan Microwave. *Reka Buana: Jurnal Ilmiah Teknik Sipil dan Teknik Kimia*, 4(1), p. 63–67.

- Hermastuti. 2017. *Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder dari Fraksi N-Heksana Daun Vitex trifolia Linn Asal Yogyakarta*. Universitas Negeri Jakarta. p. 3-18.
- Indrayudha, P., & Cahyani, I. G. 2020. Cytotoxic Activity of Ethanol Extract Legundi Leaf (*Vitex trifolia* L.) and N-Hexan, Ethyl Acetate and Ethanol-Water Fraction against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(11), p. 779–785.
- Inggarwati, E. D., Istighfarini, V. N., & Prasetyo, A. 2020. Sintesis Komposit Bi₄Ti₃O₁₂/TiO₂ dengan Metode Sonikasi. *Jurnal Ilmu Dasar*, 21(2), p. 81–86.
- Kementerian Kesehatan RI. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia* (Edisi II). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. p. 280-284.
- Kementerian Kesehatan RI. 2023a. *Buku Saku Tata Laksana Kasus Malaria*. p. 1-23. <https://malaria.kemkes.go.id/malaria-data/book>
- Kementerian Kesehatan RI. 2023b. *Laporan Tahunan Malaria 2022* (I. Elyazar & L. Ekawati, Ed.). p. 5-19. <https://malaria.kemkes.go.id/node/187>
- Manaf, S. R., & Mohd Daud, H. 2016. Screening of phytochemical properties and antimicrobial activity of Malaysian medicinal plants against aquatic bacteria. *Malaysian Journal of Microbiology*, 12(4), p. 284–290. <https://doi.org/10.21161/mjm.83816>
- Maurya, A. 2018. Vacuum Liquid Chromatography: Simple, Efficient and Versatile Separation Technique for Natural Products. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 7(2), p. 1–3. <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.07.555710>
- Milner, D. A. 2018. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), p. 1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Mottaghpisheh, J., Kamali, M., Doustimotlagh, A. H., Nowroozzadeh, M. H., Rasekh, F., Hashempur, M. H., & Iraj, A. 2024. A comprehensive review of ethnomedicinal approaches, phytochemical analysis, and pharmacological potential of *Vitex trifolia* L. *Frontiers in Pharmacology*, 15, p. 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1322083>
- Muniroh, L., Andriyansah, & Kuraesin, E. 2024. The Effect Of Pricing, Taste, And Service Quality On Customer Satisfaction (Case Study Of Restaurant Bunder Lab Bogor). *Manager : Jurnal Ilmu Manajemen*, 7(4), p. 1–12.
- Natasa, E., Ferdinan, A., & Kurnianto, E. 2021. Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Akar Bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk.). *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*, 1(2), p. 155–162.
- Nurani, L. H., Edityaningrum, C. A., & Guntarti, A. 2024. *Teknik Ekstraksi dan Analisis Kimia Tumbuhan Obat* (R. Purwandari, Ed.). UAD Press. p. 7-67.
- Nurliansyah, Ridwanto, Dalimunthe, G. I., & Yuniarti, R. 2024. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Fraksi Polar, Semi Polar dan Nonpolar Daun Sirih Cina (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) Dengan Metode DPPH. *Jurnal Kesehatan Tambusai*, 5(4), p. 12842–12854.
- Oleszek, W., Kapusta, I., & Stochmal, A. 2008. TLC of Triterpenes (Including Saponins). Dalam *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (1 ed., Vol. 99, hlm. 519–541).

- Pandey, & Chauhan, V. S. 1998. Heme Polymerization by Malarial Parasite: A Potential Target for Antimalarial Drug Development. *Current Science*, 75(9), p. 911–918.
- Pandey, Tekwani, B. L., Singh, R. L., & Chauhan, V. S. 1999. Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), p. 19383–19388.
- Pangisian, J., Sangi, M. S., & Kumaunang, M. 2022. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Antioksidan serta Antibakteri Biji Buah Pangi (*Pangium edule* Reinw). *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, 7(1), p. 11–19.
- Pratama, A. M. P., & Mahmudah, N. 2024. Perbandingan Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Fraksi N-Heksana dan Fraksi Etil Asetat Daun Rambusa (*Passiflora Foetida* L.) terhadap Bakteri *Streptococcus Pyogenes*. *Jurnal Keilmuan dan Keislaman*, p. 378–389. <https://doi.org/10.23917/jkk.v3i4.426>
- Purwanitingsih, E., Mayasari, Y., & Ningrum, F. 2023. Identifikasi Deksametason Pada Jamu Pegal Linu Yang Beredar Di Pasar Cislak Kota Depok Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Anakes : Jurnal Ilmiah Analis Kesehatan*, 9(1), p. 96–101. <https://doi.org/10.37012/anakes.v9i1.1561>
- Purwanto. 2011. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penghambat Polimerisasi Hem dari Fungi Endofit Tanaman Artemisia annua L.* Universitas Gadjah Mada. p. 50-76.
- Putri, W. S., & Warditiani, N. K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.). *Journal Pharmacon*, 9(4), p. 56–59.
- Reid, R. G., & Sarker, S. D. 2006. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. Dalam *Natural Products Isolation* (Vol. 20, hlm. 117–157). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:117>
- Rojas-Sandoval, J. 2022. *Vitex trifolia* (simple-leaf chaste-tree). Dalam *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.56555>
- Rosamah, E. 2019. *Kromatografi Lapis Tipis: Metode Sederhana Dalam Analisis Kimia Tumbuhan Berkayu* (A. H. Khanz, Ed.). Mulawarman University Press. p. 4-24.
- Saklani, S., Mishra, A., Chandra, H., Atanassova, M., Stankovic, M., Sati, B., Shariati, M., Nigam, M., Khan, M., Plygun, S., Elmsellem, H., & Suleria, H. 2017. Comparative Evaluation of Polyphenol Contents and Antioxidant Activities between Ethanol Extracts of *Vitex negundo* and *Vitex trifolia* L. Leaves by Different Methods. *Plants*, 6(4), p. 45. <https://doi.org/10.3390/plants6040045>
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (Ed.). 2006. *Natural Products Isolation* (Second Edition). Humana Press. p. 117-157.
- Sayakti, P. I., Anisa, N., & Ramadhan, H. 2022. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Menggunakan Metode CUPRAC. *Jurnal Ilmiah Farmasi (Scientific Journal of Pharmacy) Special Edition*, p. 97–106.
- Sengun, S., Ingrouille, M., Paton, A., & de Kok, R. P. J. 2024. Taxonomic revision of the *Vitex trifolia* complex (Lamiaceae). *Blumea - Biodiversity, Evolution*

- and Biogeography of Plants*, 69(2), p. 93–121. <https://doi.org/10.3767/blumea.2024.69.02.01>
- Setyawaty, R., Aptuning B, R., & Dewanto. 2020. Preliminary Studies on the Content of Phytochemical Compounds On Skin of Salak Fruit (*Salaccazalacca*). *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 6(1), p. 1–6.
- Shibeshi, M. A., Kifle, Z. D., & Atnafie, S. A. 2020. Antimalarial Drug Resistance and Novel Targets for Antimalarial Drug Discovery. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, p. 4047–4060. <https://doi.org/10.2147/IDR.S279433>
- Slater, A. F. G., & Cerami, A. 1992. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*, 355(6356), p. 167–169. <https://doi.org/10.1038/355167a0>
- Sucipto, C. D. 2015. *Manual Lengkap Malaria*. Gosyen Publishing. p. 1-35.
- Suhaenah, A., & Nuryanti, S. 2017. Skrining Fitokimia Ekstrak Jamur Kancing (*Agaricus bisporus*). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(1), p. 199–204.
- Tang, T., Xu, W., Ma, J., Wang, H., Cui, Z., Jiang, T., & Li, C. 2019. Inhibitory Mechanisms of DHA/CQ on pH and Iron Homeostasis of Erythrocytic Stage Growth of *Plasmodium falciparum*. *Molecules*, 24(10), p. 1941. <https://doi.org/10.3390/molecules24101941>
- Triastuti, A. 2021. *Farmakognosi & Obat Tradisional*. Universitas Islam Indonesia. p. 125-139.
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. M. 1984. *Plant Drug Analysis* (Second Edition). Springer Berlin Heidelberg. p. 51-227. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02398-3>
- Wahyuni, S., & Marpaung, M. P. 2020. Penentuan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Etanol Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Dalton : Jurnal Pendidikan Kimia dan Ilmu Kimia*, 3(2), p. 52–61.
- WHO. 2023. *World Malaria Report 2023*. World Health Organization. Tersedia di: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> [Diakses 10 Jan. 2025]
- Widyaningrum, N. R., & Ningrum, A. N. 2021. Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis dan Aktivitas Antipiretik Ekstrak Etanol Daun *Ipomoea carnea* Jacq Melalui Induksi Pepton Pada Mencit Jantan. *Avicenna : Journal of Health Research*, 4(2), p. 91–106.
- Wigati, D., & Rahardian, R. R. 2018. Penetapan Standarisasi Non Spesifik Ekstrak Etanol Hasil Perkolasi Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr). *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik (JIFFK)*, 15(2), p. 36–40.
- Wijaya, A., & Noviana, N. 2022. Penetapan Kadar Air Simplisia Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) Berdasarkan Perbedaan Metode Pengeringan. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 4(2), p. 185–194.
- Wusu, R. L., Ola, A. R. B., Berek, M. F. B., Dapa, P. T., & Lamak, Y. G. 2022. Fraksinasi Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Umbi Bunga Kelelawar Hitam (*Tacca chantrieri* André). *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*, 1(1), p. 134–139.
- Zakiah, M., Syarif, R. A., Mustofa, M., Jumina, J., Fatmasari, N., & Sholikhah, E. N. 2021. In Vitro Antiplasmodial, Heme Polymerization, and Cytotoxicity of Hydroxyxanthone Derivatives. *Journal of Tropical Medicine*, 2021, p. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2021/8866681>

Zhou, W., Wang, H., Yang, Y., Chen, Z.-S., Zou, C., & Zhang, J. 2020. Chloroquine against malaria, cancers and viral diseases. *Drug Discovery Today*, 25(11), p. 2012–2022. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.010>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Simplisia Daun Legundi (*Vitex trifolia* L.)



Kemenkes
RS Sardjito

♣ Jl. Kesehatan No. 1 Sekip Yogyakarta
☎ +62-274-587333
🌐 <http://www.sardjito.co.id>

Kepada
Fitra Romadhonyah
Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Terpadu FMIPA, Universitas Islam Indonesia
Kampus Terpadu UII, Jl. Kaliurang No.Km. 14.5, Umbulmartani, Kec. Sleman, Kab. Sleman, DIY 55584

LAPORAN HASIL UJI

Nomor : TL.02.04/D.XI.6/24934.1172/2024
Nomor permohonan : PE/X/2024/39
Tanggal terbit : 10 Oktober 2024
Halaman : 1 dari 2

IDENTITAS SAMPEL

Nama sampel : Legundi
Merek : -
Bentuk sampel : Simplisia Daun
Keterangan sampel : -

Tanggal Penerimaan : 9 Oktober 2024
Tanggal Pelaksanaan : 10 Oktober 2024
Jenis Pengujian : Fisika/Kimia/Mikrobiologi
Hasil Pengujian : Terlampir

Laporan Hasil Uji ini hanya berlaku untuk sampel tersebut di atas. Laporan Hasil Uji terdiri dari 2 halaman dan merupakan bagian yang tidak dapat dipisahkan.

HASIL PENGUJIAN

Nomor : TL.02.04/D.XI.6/24934.1172/2024
Nomor pengujian : PE/X/2024/39
Halaman : 2 dari 2

Parameter	Satuan	Hasil	Metode Uji / Teknik
Determinasi Tanaman			Organoleptik
Famili	-	Lamiaceae	
Spesies	-	<i>Vitex trifolia</i> L.	
Sinonim	-	<i>Vitex indica</i> Mill.	

Kepala Instalasi Penunjang,
Penelitian, dan Penyediaan Produk,

Santoso, S.Farm.
NIP. 198204092006041003

Laporan Hasil Uji ini hanya berlaku untuk sampel tersebut di atas. Laporan Hasil Uji terdiri dari 2 halaman dan merupakan bagian yang tidak dapat dipisahkan.

Lampiran 2. Hasil Pengamatan Warna Bercak dan Nilai Rf

Identifikasi alkaloid dengan pereaksi semprot Dragendorff

Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1)

Sampel	Bercak	Rf	Hasil Pengamatan Bercak			Pereaksi Semprot
			Visibel	UV 254	UV 366	
Fraksi Etil Asetat	1	0,04	-	-	Merah muda	-
	2	0,5	-	-	Merah muda	-
	3	0,625	-	-	Merah muda	-
	4	0,75	-	-	Merah muda	-
Ekstrak Etanol	1	0,04	-	-	Merah muda	-
	2	0,51	-	-	Merah muda	-
	3	0,65	-	-	Merah muda	-
	4	0,76	-	-	Merah muda	-

Identifikasi flavonoid dengan pereaksi semprot $AlCl_3$

Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1)

Sampel	Bercak	Rf	Hasil Pengamatan Bercak			Pereaksi Semprot
			Visibel	UV 254	UV 366	
Fraksi Etil Asetat	1	0,06	-	-	Merah muda	-
	2	0,11	-	-	-	Biru
	3	0,13	-	Hijau tua	-	-
	4	0,23	-	-	-	Biru
	5	0,46	-	-	Merah muda	-
	6	0,6	-	-	Merah muda	-
	7	0,64	-	-	Merah muda	-
	8	0,74	-	-	Merah muda	Merah muda
	9	0,77	-	-	Merah muda	-
Ekstrak Etanol	1	0,14	-	Hijau tua	-	-
	2	0,48	-	-	-	-
	3	0,76	-	-	Merah muda	-
	4	6,1	-	-	Merah	-
	5	6,2	-	-	-	Biru

Identifikasi fenol dengan pereaksi semprot $FeCl_3$

Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1)

Sampel	Bercak	Rf	Hasil Pengamatan Bercak			Pereaksi Semprot
			Visibel	UV 254	UV 366	
Fraksi Etil Asetat	1	0,45	-	-	Merah muda	-
	2	0,6	-	-	Merah muda	-
	3	0,7	-	-	Merah muda	-
Ekstrak Etanol	1	0,45	-	-	Merah muda	-
	2	0,6	-	-	Merah muda	-
	3	0,7	-	-	Merah muda	-

Identifikasi terpenoid dengan pereaksi semprot vanillin-asam sulfat

Pereaksi semprot: n-heksana:etil asetat (4:1)

Sampel	Bercak	Rf	Hasil Pengamatan Bercak			Pereaksi Semprot
			Visibel	UV 254	UV 366	
Fraksi Etil Asetat	1	0	Kuning-kecokelatan	Hitam	Merah muda	Ungu-kehitaman
	2	0,075	-	Hitam	Hitam	-
	3	0,21	-	-	Merah muda	-
	4	0,3	-	-	Merah muda	-
	5	0,4	-	-	Merah muda	-
	6	0,54	-	-	Merah muda	-
	7	0,625	-	-	Merah muda	-
Ekstrak Etanol	1	0	Kuning-kecokelatan	Hitam	Merah muda	Ungu-kehitaman
	2	0,09	-	Hitam	Hitam	-
	3	0,19	-	-	Merah muda	-
	4	0,225	-	-	Merah muda	-
	5	0,3	-	-	-	Ungu-kehitaman
	6	0,39	-	-	Merah muda	-
	7	0,54	-	-	Merah muda	-
	8	0,59	-	-	Merah muda	-
	9	0,625	-	-	Merah muda	-

Identifikasi triterpenoid, saponin, dan steroid dengan pereaksi semprot
Liebermann-Burchard

Fase gerak: n-heksana:etil asetat (2:1)

Sampel	Bercak	Rf	Hasil Pengamatan Bercak			Pereaksi Semprot
			Visibel	UV 254	UV 366	
Fraksi Etil Asetat	1	0	-	Hitam	Merah muda	Kuning samar
	2	0,05	-	Hitam	Merah muda	Merah muda
	3	0,14	-	-	Merah muda	Putih
	4	0,2	-	-	Merah muda	Kuning
	5	0,26	-	-	Merah muda	Kuning samar
	6	0,31	-	-	Merah muda	Biru
	7	0,44	-	-	Merah muda	Merah muda
	8	0,55	-	-	Merah muda	Merah muda
	9	0,7	-	-	Merah muda	Merah muda
	10	0,79	-	-	Merah muda	Merah muda
	11	0,86	-	-	Merah muda	Biru
Ekstrak Etanol	1	0	-	Hitam	Merah muda	Kuning ringan
	2	0,05	-	-	Merah muda	Merah muda
	3	0,56	-	-	Merah muda	Merah muda
	4	0,71	-	-	Merah muda	Merah muda
	5	0,81	-	-	Merah muda	Merah muda

Lampiran 3. Mapping Pembacaan Absorbansi Pada Microplate 96 Sumuran.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KB 3.9	KB 3.9	KB 3.9	E 7.8	E 7.8	E 7.8	E 125	E 125	E 125	EA 125	EA 125	EA 125
B	KB 7.8	KB 7.8	KB 7.8	E 11.7	E 11.7	E 11.7	E 250	E 250	E 250	EA 250	EA 250	EA 250
C	KB 15.6	KB 15.6	KB 15.6	E 15.6	E 15.6	E 15.6	E 500	E 500	E 500	EA 500	EA 500	EA 500
D	KB 31.25	KB 31.25	KB 31.25	E 23.55	E 23.55	E 23.55	E 1000	E 1000	E 1000	EA 625	EA 625	EA 625
E	KB 62.5	KB 62.5	KB 62.5	E 31.25	E 31.25	E 31.25	EA 7.8	EA 7.8	EA 7.8	EA 750	EA 750	EA 750
F	KB 125	KB 125	KB 125	E 46.875	E 46.875	E 46.875	EA 15.6	EA 15.6	EA 15.6	EA 875	EA 875	EA 875
G	KD	KD	KD	E 62.5	E 62.5	E 62.5	EA 31.25	EA 31.25	EA 31.25	EA 1000	EA 1000	EA 1000
H	KNa	KNa	KNa	E 93.75	E 93.75	E 93.75	EA 62.5	EA 62.5	EA 62.5			

Keterangan:

KB = Kurva baku

KD = Kontrol DMSO 10%

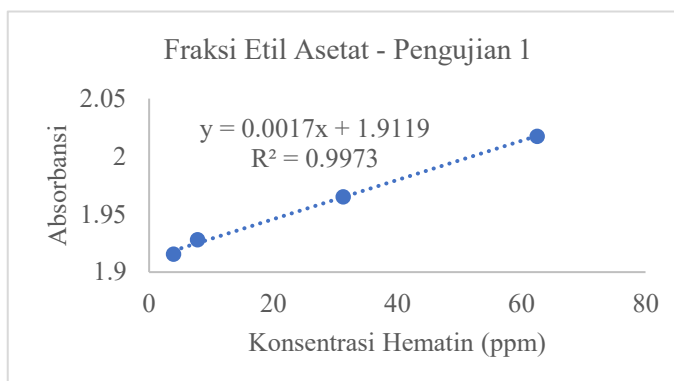
KNa = Kontrol NaOH 0,2 M

E = Ekstrak etanol daun legundi

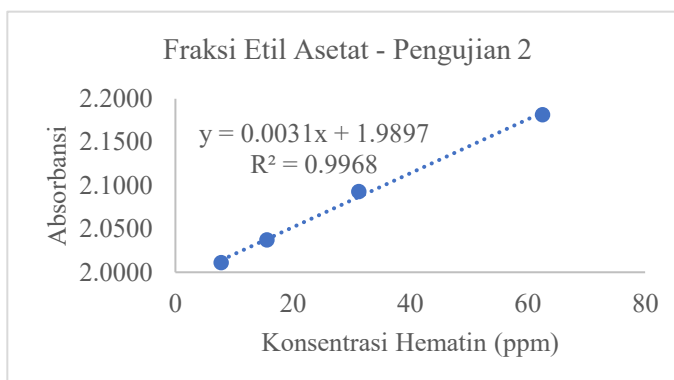
EA = Fraksi etil asetat daun legundi

Lampiran 4. Kurva Baku Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.

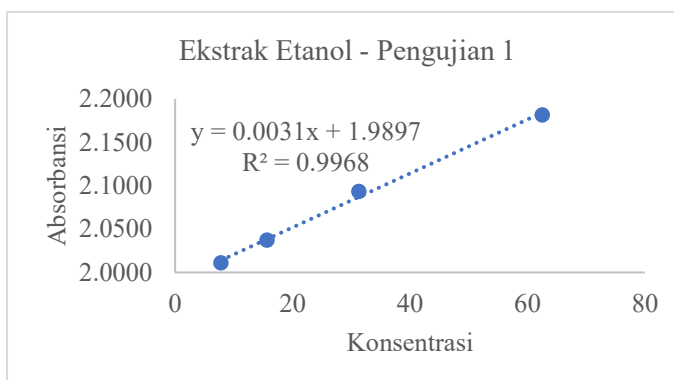
Konsentrasi	Absorbansi
3,9	1,9156
7,8	1,92795
31,25	1,96525
62,5	2,01735



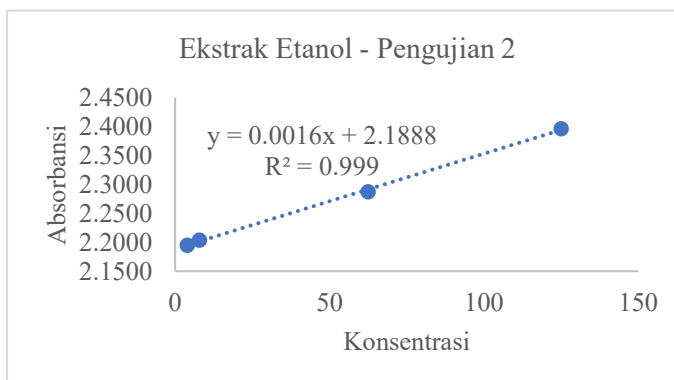
Konsentrasi	Absorbansi
3,9	2,0112
7,8	2,0372
31,25	2,0932
62,5	2,1816



Konsentrasi	Absorbansi
7,8	2,0112
15,6	2,0372
31,25	2,0932
62,5	2,1816



Konsentrasi	Absorbansi
3,9	2,1951
7,8	2,2039
62,5	2,2875
125	2,3961



Lampiran 5. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem.

Sampel	Uji Ke-	Kons.	Rata-rata Absorbansi	%Penghambatan	IC ₅₀ (µg/mL)	Rata-rata ± SD
Fraksi Etil Asetat	1	1000	1,9144	98,38%	177,962	189,69 ± 16,59
		500	1,9781	57,15%		
		62,5	2,04035	16,86%		
		7,8	2,04925	11,10%		
	2	625	2,0103	90,13%	201,417	
		500	2,0842	54,62%		
		250	2,0886	52,54%		
		125	2,1248	35,14%		
Ekstrak Etanol	1	62,5	2,1350	30,26%	13,043	13,85 ± 1,14
		7,8	2,26165	34,13%		
		11,7	2,1918	51,05%		
		15,6	2,16365	57,87%		
	2	23,55	2,15275	60,51%	14,661	
		31,25	2,2099	89,58%		
		15,6	2,2568	66,43%		
		11,7	2,34765	21,57%		
		7,8	2,36	15,48%		

Rumus Persentase Penghambatan Polimerisasi Hem

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{\beta\text{-hematin kontrol DMSO 10\%} - \beta\text{-hematin sampel}}{\beta\text{-hematin kontrol DMSO 10\%}} \times 100\%$$

Nilai Konsentrasi Hematin dalam Kontrol DMSO 10%

Sampel	Uji Ke-	Rumus Regresi	Rata-rata Absorbansi	β-Hematin
Ekstrak Etanol	1	y = 0,0031x + 1,9897	2,4048	133,1903
	2	y = 0,0016x + 2,1888	2,39135	126,5938
Fraksi Etil Asetat	1	y = 0,0017x + 1,9119	2,0664	90,8824
	2	y = 0,0031x + 1,9897	2,198	67,1935

Lampiran 6. Analisis Statistik Probit dengan SPSS Versi 25.

Hasil Pengujian Pertama Fraksi Etil Asetat

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Kons			95% Confidence Limits for log(Kons) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
.010	2.415	.	.	.383	.	.
.020	3.997	.	.	.602	.	.
.030	5.503	.	.	.741	.	.
.040	6.999	.	.	.845	.	.
.050	8.511	.	.	.930	.	.
.060	10.053	.	.	1.002	.	.
.070	11.633	.	.	1.066	.	.
.080	13.258	.	.	1.122	.	.
.090	14.931	.	.	1.174	.	.
.100	16.658	.	.	1.222	.	.
.150	26.205	.	.	1.418	.	.
.200	37.562	.	.	1.575	.	.
.250	51.158	.	.	1.709	.	.
.300	67.513	.	.	1.829	.	.
.350	87.303	.	.	1.941	.	.
.400	111.420	.	.	2.047	.	.
.450	141.078	.	.	2.149	.	.
.500	177.962	.	.	2.250	.	.
.550	224.490	.	.	2.351	.	.
.600	284.244	.	.	2.454	.	.
.650	362.766	.	.	2.560	.	.
.700	469.102	.	.	2.671	.	.
.750	619.077	.	.	2.792	.	.
.800	843.144	.	.	2.926	.	.
.850	1208.590	.	.	3.082	.	.
.900	1901.239	.	.	3.279	.	.
.910	2121.093	.	.	3.327	.	.
.920	2388.839	.	.	3.378	.	.
.930	2722.412	.	.	3.435	.	.
.940	3150.312	.	.	3.498	.	.
.950	3721.014	.	.	3.571	.	.
.960	4524.949	.	.	3.656	.	.
.970	5755.085	.	.	3.760	.	.
.980	7922.897	.	.	3.899	.	.
.990	13112.963	.	.	4.118	.	.

Hasil Pengujian Kedua Fraksi Etil Asetat

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Kons			95% Confidence Limits for log(Kons) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
.010	3.434	.	.	.536	.	.
.020	5.534	.	.	.743	.	.
.030	7.491	.	.	.875	.	.
.040	9.406	.	.	.973	.	.
.050	11.320	.	.	1.054	.	.
.060	13.253	.	.	1.122	.	.
.070	15.218	.	.	1.182	.	.
.080	17.223	.	.	1.236	.	.
.090	19.275	.	.	1.285	.	.
.100	21.380	.	.	1.330	.	.
.150	32.833	.	.	1.516	.	.
.200	46.173	.	.	1.664	.	.
.250	61.862	.	.	1.791	.	.
.300	80.446	.	.	1.906	.	.
.350	102.617	.	.	2.011	.	.
.400	129.279	.	.	2.112	.	.
.450	161.652	.	.	2.209	.	.
.500	201.417	.	.	2.304	.	.
.550	250.963	.	.	2.400	.	.
.600	313.807	.	.	2.497	.	.
.650	395.344	.	.	2.597	.	.
.700	504.300	.	.	2.703	.	.
.750	655.798	.	.	2.817	.	.
.800	878.629	.	.	2.944	.	.
.850	1235.608	.	.	3.092	.	.
.900	1897.548	.	.	3.278	.	.
.910	2104.713	.	.	3.323	.	.
.920	2355.480	.	.	3.372	.	.
.930	2665.831	.	.	3.426	.	.
.940	3061.023	.	.	3.486	.	.
.950	3583.734	.	.	3.554	.	.
.960	4312.986	.	.	3.635	.	.
.970	5415.914	.	.	3.734	.	.
.980	7330.500	.	.	3.865	.	.
.990	11812.282	.	.	4.072	.	.

PROBIT^a

Hasil Pengujian Pertama Ekstrak Etanol
Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Kons			95% Confidence Limits for log(Kons) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
.010	.284	.005	1.058	-.547	-2.301	.025
.020	.444	.012	1.426	-.352	-1.904	.154
.030	.591	.022	1.724	-.229	-1.652	.237
.040	.732	.034	1.989	-.136	-1.463	.299
.050	.871	.049	2.234	-.060	-1.309	.349
.060	1.010	.066	2.466	.004	-1.177	.392
.070	1.150	.087	2.690	.061	-1.063	.430
.080	1.292	.110	2.908	.111	-.960	.464
.090	1.436	.136	3.121	.157	-.866	.494
.100	1.583	.166	3.332	.200	-.780	.523
.150	2.370	.377	4.371	.375	-.424	.641
.200	3.265	.721	5.432	.514	-.142	.735
.250	4.299	1.256	6.559	.633	.099	.817
.300	5.503	2.061	7.794	.741	.314	.892
.350	6.918	3.245	9.193	.840	.511	.963
.400	8.597	4.944	10.856	.934	.694	1.036
.450	10.607	7.274	13.024	1.026	.862	1.115
.500	13.043	10.136	16.348	1.115	1.006	1.213
.550	16.039	13.064	22.189	1.205	1.116	1.346
.600	19.789	15.881	32.218	1.296	1.201	1.508
.650	24.589	18.859	48.811	1.391	1.276	1.689
.700	30.913	22.301	76.651	1.490	1.348	1.885
.750	39.573	26.536	125.624	1.597	1.424	2.099
.800	52.100	32.070	218.682	1.717	1.506	2.340
.850	71.789	39.876	418.503	1.856	1.601	2.622
.900	107.456	52.326	949.338	2.031	1.719	2.977
.910	118.451	55.861	1157.308	2.074	1.747	3.063
.920	131.675	59.967	1435.300	2.120	1.778	3.157
.930	147.925	64.826	1818.786	2.170	1.812	3.260
.940	168.456	70.713	2369.610	2.226	1.849	3.375
.950	195.372	78.074	3204.497	2.291	1.893	3.506
.960	232.539	87.697	4568.949	2.366	1.943	3.660
.970	288.056	101.154	7067.592	2.459	2.005	3.849
.980	382.893	122.267	12624.209	2.583	2.087	4.101
.990	599.638	164.786	31508.653	2.778	2.217	4.498

Hasil Pengujian Kedua Ekstrak Etanol
Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Kons			95% Confidence Limits for log(Kons) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
.010	4.027	.	.	.605	.	.
.020	4.686	.	.	.671	.	.
.030	5.158	.	.	.712	.	.
.040	5.545	.	.	.744	.	.
.050	5.880	.	.	.769	.	.
.060	6.182	.	.	.791	.	.
.070	6.459	.	.	.810	.	.
.080	6.718	.	.	.827	.	.
.090	6.962	.	.	.843	.	.
.100	7.195	.	.	.857	.	.
.150	8.245	.	.	.916	.	.
.200	9.187	.	.	.963	.	.
.250	10.080	.	.	1.003	.	.
.300	10.957	.	.	1.040	.	.
.350	11.837	.	.	1.073	.	.
.400	12.737	.	.	1.105	.	.
.450	13.673	.	.	1.136	.	.
PROBIT ^a .500	14.661	.	.	1.166	.	.
.550	15.721	.	.	1.196	.	.
.600	16.877	.	.	1.227	.	.
.650	18.160	.	.	1.259	.	.
.700	19.619	.	.	1.293	.	.
.750	21.324	.	.	1.329	.	.
.800	23.399	.	.	1.369	.	.
.850	26.072	.	.	1.416	.	.
.900	29.875	.	.	1.475	.	.
.910	30.874	.	.	1.490	.	.
.920	31.997	.	.	1.505	.	.
.930	33.279	.	.	1.522	.	.
.940	34.771	.	.	1.541	.	.
.950	36.555	.	.	1.563	.	.
.960	38.768	.	.	1.588	.	.
.970	41.673	.	.	1.620	.	.
.980	45.875	.	.	1.662	.	.
.990	53.375	.	.	1.727	.	.