

AKTIVITAS ANTIPLASMODIUM EKSTRAK HIDROTROPI DAUN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness.) SECARA In Vitro PADA *Plasmodium falciparum* STRAIN G-2300 RESISTEN KLOOROQUIN

Yance Anas^{1*}, Rita Dwi Ratnani², Laeli Kurniasari² dan Indah Hartati²

¹Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang

²Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim, Semarang

*Email: yance.apt@gmail.com

INTISARI

Ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) telah lama dikenal sebagai antimalaria. Telah dikembangkan ekstrak hidrotropi daun sambiloto (EHDS) dengan menggunakan larutan senyawa hidrotrop sodium asetat 2 mol/L. Proses ekstraksi berlangsung selama 2 jam, lebih cepat dibandingkan proses ekstraksi secara konvensional. Hasilnya adalah dua jenis EHDS dengan perbedaan suhu pengadukan, yaitu pada suhu 30°C (EHDS1) dan suhu 35°C (EHDS2). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dan membandingkan aktivitas antiplasmodium EHDS1 dan EHDS2 secara in vitro. Uji aktivitas antiplasmodium EHDS1 dan EHDS2 (0,1-50,0) g/mL dilakukan secara tripilikat pada *P. falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin yang diinkubasi selama 48 jam. Persentase parasitemia diukur dengan melihat apusan darah setelah diwarnai dengan pewarna Giemsa. Persentase hambatan pertumbuhan *P.falciparum* dihitung dengan membandingkan persentase pertumbuhan parasitemia dengan kelompok kontrol dan nilai IC₅₀ dihitung dengan analisis probit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa EHDS1 dan EHDS2 mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin berturut-turut sebesar (14,62-43,25)% dan (24,06-49,48)%. Nilai IC₅₀ EHDS1 dan EHDS2 adalah sebesar 59,689 µg/mL dan 44,541 µg/mL. Berdasarkan data tersebut, EHDS sebaiknya dibuat dari larutan sodium asetat 2 mol/L dengan pengadukan pada suhu 35 °C karena aktif sebagai antiplasmodium.

Kata kunci: Antiplasmodium, ekstrak hidrotropi daun sambiloto, *P. falciparum* strain G-2300, in vitro

ABSTRACT

The bitter leaf extract (*Andrographis paniculata* Ness.) has long been known as an anti-malarial. Our previous research has developed a bitter leaf hydrotrophy extract (BLHE) using a sodium acetate 2 mol/L as a hydrotrop compound solution. The extraction process lasts for 2 hours, faster than conventional extraction. The result is two types of BLHE with different stirring temperatures, at 30°C (BLHE1) and 35°C (BLHE2). This study meant to determine and compare the in vitro anti-plasmodial activity BLHE1 and BLHE2. The anti-plasmodial activity of BLHE1 and BLHE2 (0.1-50.0) g/mL performed on a G-2300 strain of *P. falciparum* (chloroquine-resistant) after incubated for 48 hours (triplicate). The percentage of parasitemia determined through an examination of blood smears stained with Giemsa. The percentage of growth inhibition of *P. falciparum* evaluates by comparing percentage of growth with the control group and IC₅₀ determine by probit analysis. The results showed that BLHE1 and BLHE2 respectively were able to inhibit the growth of *P. falciparum* of 14.62% - 43.25% (IC₅₀: 59.689 µg/mL) and 24.06% - 49.48% (IC₅₀: 44.541 µg/mL).

Based on these data, BLHE should produce with sodium acetate 2 mol/L, with stirring at 35°C, because this condition will obtain BLHE that active as anti-plasmodial.

Keywords: Anti-plasmodial, bitter leaf hydrotrophy extract, *P. falciparum* strain G-2300, in vitro

*Corresponding author:

Nama : Yance Anas

Institusi : Bagian Farmakologi & Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim

Alamat institusi : Jl. Menoreh Tengah X/22 Sampangan Semarang 50536

E-mail : yance.apt@gmail.com

PENDAHULUAN

Sambiloto merupakan salah satu sumber bahan obat tradisional yang sangat populer di berbagai negara kawasan asia, termasuk di Indonesia. Tanaman jenis perdu yang dikenal sabagai “Raja Pahit” ini diyakini memiliki banyak khasiat untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit, seperti influenza, penyakit saluran cerna dan pernafasan, herpes, demam, infeksi saluran pernafasan, dan berbagai penyakit infeksi lainnya, termasuk malaria (Prapanza dan Mariantio, 2003). Berbagai ekstrak dari tanaman ini telah diuji khasiatnya dalam menghambat pertumbuhan plasmodium sebagai penyebab penyakit malaria. Ekstrak terstandar sambiloto terbukti mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit (Kusumawardhani dkk., 2005). Hasil penelitian Resi (2014), juga menyebutkan bahwa ekstrak etanol herba sambiloto memiliki efek antimalaria pada *Plasmodium falciparum* secara in vitro. Senyawa aktif yang banyak terkandung dalam daun sambiloto adalah andrografolid, neoandrografolid, 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid, 14-deoksiandrografolid, isoandrografolid, homoandrografolid, 14-deoksiandrografolid 19 β -D-glukosida, andrografan, andrografosterin, dan stigmasterol. Andrografolid telah terbukti memiliki efek hepatoprotektor, menghambat replikasi DNA virus HIV, efek virisidal terhadap virus herpes, menghambat proliferasi berbagai sel kanker, efek antiinflamasi dan antipiretik, efek antimalaria dengan menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* dan *Plasmodium falciparum*, serta efek antidiare dengan menghambat motilitas usus (Jarukamjorn dan Nemoto, 2008).

Sampai saat ini, belum ada satupun senyawa aktif dari sambiloto yang telah dikembangkan dan dipasarkan untuk keperluan pengobatan malaria. Sediaan yang telah ada adalah dalam bentuk jamu yang berisi ekstrak daun sambiloto yang diformulasikan dalam sediaan kapsul (Ardhyani, 2012). Jika masih dikembangkan dalam bentuk jamu atau obat herbal terstandar yang bermutu, maka kualitas proses ekstraksi harus terus ditingkatkan, terutama perlu dilakukan optimasi yang bertujuan untuk mencegah kerusakan senyawa aktif dalam daun sambiloto, terutama pada saat proses ekstraksi. Sampai saat ini, beberapa metode ekstraksi konvensional sambiloto masih menyisakan masalah. Sambiloto dapat diekstraksi dengan cairan penyari alkohol, seperti dimaserasi menggunakan etanol 85% selama 2 jam pada suhu 75-80 °C (Yan dkk., 2008) dan metanol 60% selama 1 jam (Avanigadda dan Vangalapati, 2010). Meskipun efektif, metode konvensional tersebut dapat mengakibatkan degradasi pada senyawa andrografolid, karena senyawa tersebut dapat rusak oleh panas berlebih (Lomlin dkk., 2003). Selain itu, andrografolid juga dapat mengalami reaksi esterifikasi dengan alkohol (Wongkittipong dkk., 2004) yang dapat berdampak pada penurunan intensitas efek farmakologi andrografolid.

Salah satu alternatif yang dapat diterapkan dalam ekstraksi daun sambiloto adalah menggunakan teknik ekstraksi hidrotropik. Beberapa keunggulan ekstraksi daun sambiloto dengan metode ini antara lain tidak menggunakan pelarut alkohol, proses ekstraksi dilakukan pada kondisi suhu dan tekanan rendah sehingga diharapkan dapat mencegah degradasi andrografolid, serta

menggunakan medium air yang dapat menghemat biaya produksi (Ratnani dkk., 2012). Ekstraksi hidrotropik dilakukan dengan menggunakan senyawa hidrotrop yang mampu meningkatkan kelarutan senyawa aktif kurang larut air atau bahkan tidak larut dalam air (Dandekar dkk., 2008). Metode ekstraksi ini diprediksi cukup tepat digunakan untuk produksi ekstrak daun sambiloto karena senyawa andrografolid merupakan senyawa yang sukar larut dalam air.

Penelitian sebelumnya telah menghasilkan ekstrak hidrotropik daun sambiloto dengan menggunakan larutan senyawa hidrotrop sodium asetat 2 mol/L. Ekstrak yang didapatkan berbentuk serbuk kering padat, berwarna hijau tua, tidak berbau dan berasa sangat pahit. Ekstrak tersebut juga telah dipastikan mengandung senyawa andrografolid (Ratnani dkk., 2015). Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiplasmodium ekstrak hidrotropi daun sambiloto secara *in vitro* pada *Plasmodium falciparum* strain G-2300 (resisten kloroquin). Ekstrak hidrotropi daun sambiloto dibuat dengan dua kondisi yang berbeda berdasarkan suhu pengadukan, yaitu pada suhu 30°C (EHDS1) dan 35°C (EHDS2).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah herba sambiloto yang dipanen dari desa Sadeng, Kecamatan Gunungpati, Semarang, Jawa Tengah. Determinasi tanaman ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang. Bahan lain yang digunakan adalah sodium asetat anhidrat (Merck), isolat beku *Plasmodium falciparum* strain G-2300 (Laboratorium Parasitologi FK-UGM), buffer Hepes (N-(2-hidroksietil)piperazin-N-(2-asam etansulfonat)) (Sigma), medium kultur malaria lengkap RPMI 1640 (Sigma) yang terdiri dari NaHCO₃, D-sorbitol, gentamisin sulfat, serum dan sel darah manusia golongan O[±] (sukarelawan, laboratorium Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran UGM), akuades (Otsuka), DMSO (Sigma), dan pewarna Giemsa (Merck). Alat yang digunakan diantaranya oven (Memmert), ayakan 40 Mesh, pengaduk magnetik (IKA[®]C-MAG HS7), pipet ukur, pipet mikro (Gilson), pipet Pasteur, *microplate* 96 sumuran (NuncclonTM), tabung heparin (Vacuette), *dissosable conical tubes* (NuncTM), *tissue culture flask* (TCF) 50 mL (NuncclonTM), sentrifus (Eppendorf), inkubator CO₂ (Napco), *laminar air flow* (Labconco), filter 0,22µm (Achrodisc), *waterbath*, *candle jar* dan mikroskop (Zeiss).

Pembuatan Ekstrak Hidrotropi Daun Sambiloto

Pembuatan simplisia kering daun sambiloto dimulai dari pemisahan daun dari bagian lain (sortasi basah), pencucian dengan air mengalir, pengeringan dalam oven (suhu 40±5 °C) hingga kadar air kurang dari 10%. Ukuran simplisia daun sambiloto diperkecil dan diayak dengan ayakan 40 Mesh. Sebanyak masing-masing 20 g serbuk simplisia daun sambiloto direndam dalam 200 mL larutan sodium asetat 2 mol/L, diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama dua jam (kecepatan: 1.100 rpm pada suhu 30°C (EHDS1) dan 35°C (EHDS2), dibiarkan selama satu jam dan disaring. Ampas dicuci kembali dengan akuades dan selanjutnya larutan ekstrak dibiarkan selama satu jam hingga terbentuk endapan ekstrak. EHDS1 dan EHDS2 disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm, diambil dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40±5 °C (Ratnani dkk., 2015).

Kultur *Plasmodium falciparum* secara *In Vitro*

Modifikasi metode Trager dan Jensen (1976) digunakan untuk menumbuhkan *Plasmodium falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin. Plasmodium ditumbuhkan secara *in vitro* dalam sel darah merah manusia (O[±]), kemudian dilarutkan dengan hematokrit 1% dalam medium RPMI 1640 (gentamisin 20 g/mL, 23,78 mM NaHCO₃, 7,68 mM buffer Hepes dan 10% serum darah merah manusia (O[±])). Cawan petri yang berisi kultur plasmodium dimasukkan ke dalam *candle jar* dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Pengamatan pertumbuhan plasmodium dilakukan setiap hari.

Aktivitas Antiplasmodium Ekstrak Hidrotropi Daun Sambiloto (Yance Anas, dkk.)

Uji Aktivitas Antiplasmodium EHDS secara In Vitro

Sebelum dicampur dengan EHDS, kondisi parasitemia harus dipastikan sebesar 1% dan hematokrit sebesar 5% dengan cara *Plasmodium falciparum* strain G-2300 disuspensikan dengan media RPMI 1640. Sebanyak 100 µL suspensi parasit tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam lempeng mikrokultur 96-sumuran. Sementara itu, EHDS1 dan EHDS2 dilarutkan dengan DMSO untuk mendapatkan konsentrasi (0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 dan 50,0) µg/mL dan masing-masing diambil sejumlah 100 µL untuk dimasukkan ke dalam sumuran yang mengandung parasit. Pengujian ini dilakukan secara triplikat. Mikrokultur yang telah berisi parasit dan peringat konsentrasi EHDS1 dan EHDS 2 diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya, kultur dipanen dan dibuat sediaan apusan darah menggunakan pewarna Giemsa 10%. Pengamatan dan penghitungan jumlah eritrosit yang terinfeksi dari 1000 eritrosit dilakukan menggunakan mikroskop.

Analisis Data

Data yang didapatkan adalah persentase parasitemia (1) dan persentase hambatan pertumbuhan parasit (2). Nilai IC₅₀ yang menggambarkan aktivitas antiplasmodium EHDS1 dan EHDS2 dihitung menggunakan analisis probit pada taraf kepercayaan 95% (α : 0,05) menggunakan *software* SPSS versi 16.00

$$\%Parasitemia = \frac{\sum \text{eritrosit terinfeksi}}{1.000 \text{ eritrosit}} \times 100\% \dots\dots(1)$$

$$\% \text{ Hambatan Pertumbuhan Parasit} = \frac{Pk - Pe}{Pk} \times 100\% \dots\dots (2)$$

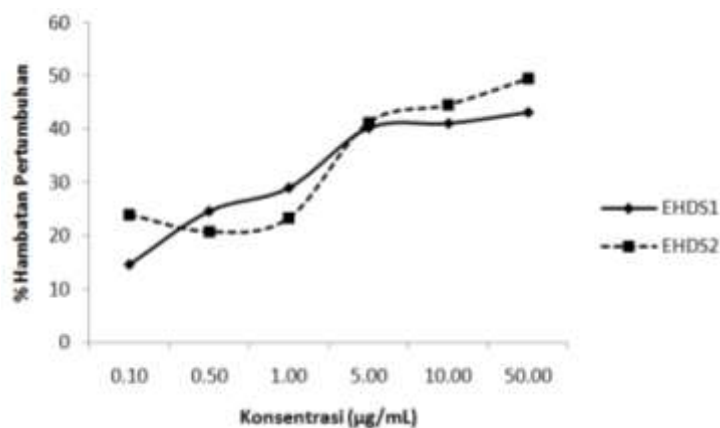
Keterangan

Pk : % Pertumbuhan parasitemia kelompok kontrol negatif

Pe : % Pertumbuhan parasitemia kelompok EHDS

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji aktivitas antiplasmodium secara in vitro menunjukkan bahwa EHDS1 dan EHDS2 mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin. Penghambatan pertumbuhan plasmodium akibat perlakuan EHDS1 dan EHDS2 selama 48 jam dapat dilihat pada Gambar 1, Tabel I dan Tabel II.



Gambar 1. Penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* strain G-2300 setelah mendapat perlakuan EHDS1 dan EHDS2 selama 48 jam

Tabel I. Persentase Parasitemia dan Hambatan Pertumbuhan *P. falciparum* Strain G-2300 setelah Perlakuan EHDS1 selama 48 jam

Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	Rep.	% Parasitemia		% Pertumbuhan	% Hambatan Pertumbuhan	Rata- rata	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		jam ke-0	jam ke-48				
0,10	1	0,7	8,06	7,36	9,88	14,62	59,689
	2	0,7	7,32	6,62	18,94		
	3	0,7	7,64	6,94	15,04		
0,50	1	0,7	5,98	5,28	35,34	24,61	
	2	0,7	7,80	7,10	13,07		
	3	0,7	6,79	6,09	25,42		
1,00	1	0,7	5,81	5,11	37,37	29,11	
	2	0,7	7,25	6,55	19,72		
	3	0,7	6,39	5,69	30,24		
5,00	1	0,7	5,99	5,29	35,21	40,30	
	2	0,7	5,90	5,20	36,26		
	3	0,7	4,83	4,13	49,42		
10,00	1	0,7	5,20	4,50	44,83	41,18	
	2	0,7	5,22	4,52	44,63		
	3	0,7	6,08	5,38	34,09		
50,00	1	0,7	4,78	4,08	50,03	43,25	
	2	0,7	6,90	6,20	24,05		
	3	0,7	4,32	3,62	55,69		
Kontrol (-)	1	0,7	9,50	8,80			
	2	0,7	8,59	7,89			
	3	0,7	8,50	7,80			
Rata-rata % Pertumbuhan Kontrol (-)				8,163			

Tabel II. Persentase Parasitemia dan Hambatan Pertumbuhan *P. falciparum* Strain G-2300 setelah Perlakuan EHDS2 Selama 48 jam

Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	Rep.	% Parasitemia		% Pertumbuhan	% Hambatan Pertumbuhan	Rata- rata	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		jam ke-0	jam ke-48				
0,10	1	0,7	5,82	5,12	37,28	24,06	44,541
	2	0,7	8,04	7,34	10,04		
	3	0,7	6,83	6,13	24,87		
0,50	1	0,7	6,47	5,77	29,34	20,89	
	2	0,7	7,14	6,44	21,16		
	3	0,7	7,87	7,17	12,18		
1,00	1	0,7	6,79	6,09	25,42	23,47	
	2	0,7	5,86	5,16	36,79		
	3	0,7	8,19	7,49	8,19		
5,00	1	0,7	4,45	3,75	54,05	41,37	
	2	0,7	6,27	5,57	31,79		
	3	0,7	5,74	5,04	38,27		
10,00	1	0,7	4,09	3,39	58,45	44,57	
	2	0,7	5,25	4,55	44,22		
	3	0,7	6,33	5,63	31,06		
50,00	1	0,7	4,42	3,72	54,44	49,48	
	2	0,7	5,59	4,89	40,12		
	3	0,7	4,47	3,77	53,87		
Kontrol (-)	1	0,7	9,50	8,80			
	2	0,7	8,59	7,89			
	3	0,7	8,50	7,80			
Rata-rata % Pertumbuhan Kontrol (-)				8,163			

Data hasil uji antiplasmodium menunjukkan bahwa penghambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin setelah mendapat perlakuan EHDS1 dan EHDS2 secara in vitro berturut-turut adalah sebesar (14,62-43,25)% dan (24,06-49,48)% dengan IC₅₀ sebesar 59,689 $\mu\text{g/mL}$ dan 44,451 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan nilai IC₅₀ tersebut, dapat disimpulkan bahwa EHDS2 aktif sebagai antiplasmodium terhadap *P. falciparum* Strain G-2300 resisten kloroquin. Sementara itu, EHDS1 kurang aktif karena memiliki nilai IC₅₀ di atas 50 $\mu\text{g/mL}$. Kohler

dkk. (2002) menyatakan bahwa ekstrak dan fraksi ekstrak dari suatu tanaman obat dapat dikatakan aktif sebagai antiplasmodium secara *in vitro* apabila nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi tersebut kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu, jika nilai IC_{50} suatu ekstrak tanaman lebih besar dari 50 $\mu\text{g/mL}$ dapat dikatakan kurang aktif dan jika lebih besar dari 100 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan tidak aktif sebagai antiplasmodium.

Perbedaan potensi antiplasmodium EHDS tersebut disebabkan karena proses perendaman simplisia EHDS2 dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari pada EHDS1. Secara umum, difusi senyawa aktif ke dalam cairan penyari akan lebih cepat pada suhu yang tinggi walaupun juga berpotensi dapat mendegradasi senyawa aktif yang dihasilkan. Ekstraksi yang dilakukan pada suhu di atas 40 °C dapat memicu kerusakan senyawa aktif, terutama senyawa polifenol dan alkaloid (Zhang dkk., 2018). Oleh karena itu, pembuatan EHDS dalam penelitian ini hanya dilakukan pada suhu di bawah 40 °C.

Secara keseluruhan, pembuatan ekstrak daun sambiloto dengan menggunakan metode ekstraksi hidrotropi menggunakan larutan hidrotrop sodium asetat 2 mol/L mampu menghasilkan ekstrak aktif sebagai antiplasmodium secara *in vitro*. EHDS2 ini berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai herbal antimalaria. Metode ekstraksi hidrotropi yang digunakan dapat mempercepat proses ekstraksi daun sambiloto sehingga akan menghemat biaya produksi pada skala industri. Proses perendaman simplisia daun sambiloto hanya berlangsung dua jam, lebih cepat dari cara maserasi konvensional yang dapat berlangsung hingga lima hari. Selain itu, simplisia daun sambiloto direndam dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada suhu rendah (35 °C) sehingga dapat meminimalkan kerusakan senyawa aktif yang terjadi selama proses ekstraksi (Ratnani, dkk., 2015).

Walaupun dapat dikatakan aktif sebagai antiplasmodium, nilai IC_{50} EHDS2 dapat dikatakan masih relatif tinggi. Berbagai ekstrak tanaman yang diteliti di Indonesia banyak yang telah terbukti aktif sebagai antiplasmodium dengan nilai IC_{50} di bawah 10 $\mu\text{g/mL}$. Sebagai perbandingan, ekstrak etanol daun pepaya yang dibuat dengan metode maserasi lebih aktif sebagai antiplasmodium secara *in vitro* dibandingkan dengan EHDS2. Nilai IC_{50} ekstrak tersebut terhadap *Plasmodium falciparum* strain G-2300 adalah 2,143 $\mu\text{g/mL}$ (Rahena, 2010). Oleh karena itu, penelitian selanjutnya diarahkan pada optimalisasi proses ekstraksi hidrotropi daun sambiloto untuk meningkatkan potensi antiplasmodium EHDS2. Salah satu strategi yang dapat dikembangkan adalah dengan mengkombinasikan proses ekstraksi hidrotropi dan gelombang mikro untuk mengoptimalkan penyarian senyawa aktif ke dalam EHDS2. Secara umum, ekstraksi dengan memanfaatkan gelombang mikro ini mampu menghasilkan ekstrak dengan rendemen yang lebih tinggi dari pada metode ekstraksi lainnya (Zhang dkk., 2018) sehingga diharapkan dapat meningkatkan potensi antiplasmodium EHDS2.

KESIMPULAN

EHDS1 dan EHDS2 mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin secara *in vitro* berturut-turut sebesar (14,62-43,25)% dan (24,06-49,48)%. Nilai IC_{50} EHDS1 dan EHDS2 dalam 48 jam sebesar 59,689 $\mu\text{g/mL}$ dan 44,451 $\mu\text{g/mL}$. EHDS2 aktif sebagai antiplasmodium secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* strain G-2300 resisten kloroquin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Mustofa, M.Kes., Apt. beserta staf dan tenaga laboran Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan asistensi dan pelatihan serta memfasilitasi pengujian aktivitas antiplasmodium secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardhyani, R., 2012, Standarisasi Bahan Baku Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) pada Proses Pembuatan Jamu Kapsul di CV. Herba Nirmala, *Tugas Akhir*, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Avanigadda, S. and Vangalapati, M., 2010, Experimental and Modelling of Andrographolide Extraction from *Andrographis paniculata*, *Int. J. Chem, Environmental and Pharmaceutical Res*, **1**, 32-36
- Dandekar, D., Jayaprakasha, G.K., and Patil, B., 2008, Hydrotropic Extraction of Bioactive Limonin From Sour Orange Seed, *Food Chemistry*, **109**, 515-520
- Jarukamjorn, K. and Nemoto, N., 2008, Pharmacological Aspect of *Andrographis paniculata* on Helath and Its Major Diterpenoid Constituent Andrographolide, *Journal of Health Science*, **54**(4), 370-381
- Kohler, I., Siems, K.J., Siems, K., Hernandes, M.A., Ibarra, R.A., Barendsohn, W.G., Bienzle, U. and Eich E., 2002, In Vitro Antiplasmodial Investigation of Medical Plants from El Savador. *J. Bioscience*, **57**(3-4), 277-281
- Kusumawardhani, D., Widyawaruyanti, A. dan Kusumawati, I., 2005, Efek Antimalaria Ekstrak Sambiloto Terstandar (Parameter Kadar Aandrografolida) pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium Berghei*, *Media Majalah Farmasi Airlangga*, **5**(1), 25-29
- Lomlin, L., Jirayupong, N. and Plubrukan, A., 2003, Heat Accelerated Degradation of Solid State Andrographolide, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **51**, 24-26
- Prapanza, E. dan Marianto, L.M., 2003, *Khasiat & Manfaat Sambiloto: Raja Pahit Penakluk Aneka Penyakit*, Agro Media Pustaka, Jakarta, 3-12
- Rahena, J.F., 2010, Uji Aktivitas Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya*. LINN) sebagai Antimalaria in vitro, *Jurnal Ilmu Dasar*, **11**(1), 96-100
- Ratnani, R.D., Hartati, I. dan Kurniasari, L., 2012, Potensi Produksi Andrographolide dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Melalui Proses Ekstraksi Hidrotropi, *Momentum*, **8**(1), 6-10
- Ratnani, R.D., Hartati, I., Anas, Y., Puspaningrum, D.E. dan Khilyati, D.D.D., 2015, Standardisasi Spesifik dan Non Spesifik Ekstraksi Hidrotropi Andrographolid dari Sambiloto (*Andrographis paniculata*), *Prosiding*, Seminar Nasional Peluang Herbal sebagai Alternatif Medicine, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang
- Resi, E.M., 2014, Effect of Antimalaria Herbal Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) on Morphology Changes of Development and Parasite *Plasmodium falciparum*, *Jurnal Info Kesehatan*, **12**(1), 661-671
- Trager, W. and Jensen, J., 1976, Human Malaria Parasite in Continuous Culture. *Science*, **193**, 673-675.
- Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S. and Gourdon, C., 2004, Solid Liquid Extraction of Andrographolide From Plants-Experimental Study, Kinetics Reaction and Model, *Separation and Purification Technology*, **4**(2), 147-154
- Yan, X., Wang, T., Ma, Z., Zhang, W., Duan, J. and Chai, Y., 2008, Crude Extract from *Andrographis paniculata*, *US Patent no 7341748*, 1-8
- Zhang, Q., Lin, L. and Ye, W., 2018, Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: a Comprehensive Review. *Chin Med* **13**(20), 1-26