

AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEME EKSTRAK DAUN SEMBUNG (*Blumea balsamifera*) SEBAGAI ANTIMALARIA

Haem polymerization inhibitory activity of Blumea balsamifera leaves extract as antimalarial

Eris Septiana¹⁾, Aulia Umaroh²⁾, Erlindha Gangga²⁾ dan Partomuan Simanjuntak^{1,2)}

Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia¹⁾

Jalan Raya Bogor KM 46 Cibinong, Bogor 16911

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila²⁾

Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640

septiana.eris@gmail.com

(diterima 28 September 2016, direvisi 26 Maret 2017, disetujui 10 April 2017)

ABSTRAK

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit *Plasmodium* yang dalam siklusnya akan mendegradasi hemeoglobin menjadi asam amino dan heme bebas yang toksik untuk parasit. Untuk menetralkan toksisitas heme bebas, parasit akan mengubahnya menjadi hemozoin melalui proses polimerisasi heme. Proses ini sangat penting dalam siklus hidup parasit sehingga dapat dijadikan sebagai target obat antimalaria. Daun sembung dilaporkan mempunyai aktivitas antimalaria baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, tetapi mekanismenya belum pernah dilaporkan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan polimerisasi heme ekstrak daun sembung dan golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak dengan aktivitas penghambatan terbaik. Daun sembung diekstrak dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol 70%. Uji antimalaria *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode penghambatan polimerisasi heme. Ekstrak dengan aktivitas penghambatan terbaik diukur nilai IC_{50} dan dilanjutkan dengan skrining fitokimia. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi heme pada konsentrasi 1 mg ml^{-1} masing-masing sebesar 11,28; 26,26; dan 56,88%. Nilai IC_{50} ekstrak etanol 70% sebesar $0,978 \text{ mg ml}^{-1}$. Ketiga ekstrak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme dan ekstrak etanol 70% memiliki aktivitas tertinggi. Skrining fitokimia menunjukkan daun sembung yang diekstrak dengan etanol 70% mengandung golongan senyawa flavonoid, triterpenoid, kuinon, tanin, dan saponin.

Kata kunci: *Blumea balsamifera*, antimalaria, *in vitro*, polimerisasi heme, skrining fitokimia

ABSTRACT

Malaria disease is caused by *Plasmodium* parasite which will degrade haemoglobin into amino acid and free haem, that is toxic for the parasite, as part of their life cycle. To neutralize its toxicity, the parasite will convert free haem into hemozoin through haem polymerization process. This process is important for the parasite, hence it can be targeted by antimalarial drugs. *Blumea balsamifera* leaf was reported to have antimalarial activity both *in vitro* and *in vivo*. However, there was no report about its mechanisms. The aim of this study was to study the haem polymerization inhibitory activity of *B. balsamifera* leaf extracts and its chemical compounds from the extract with the highest inhibitory activity. *N*-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol were used as extractor. Haem polymerization inhibitory was used as *in vitro* antimalarial assay. IC_{50} value and phytochemical screening were performed for the extract with the highest inhibitory activity. The results showed that 1 mg ml^{-1} of *n*-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol had haem polymerization inhibitory activity at 11.28, 26.26 and 56.88% respectively. The IC_{50} value of 70% ethanol extract was 0.978 mg ml^{-1} . All extracts treatments had haem polymerization inhibitory activity with 70% ethanol extract gave the highest inhibitory activity. Phytochemical screening showed that *B. balsamifera* leaf extracted with 70% ethanol contained flavonoids, triterpenoids, quinones, tannins, and saponins.

Key words: *Blumea balsamifera*, antimalarial, *in vitro*, haem polymerization, phytochemical screening

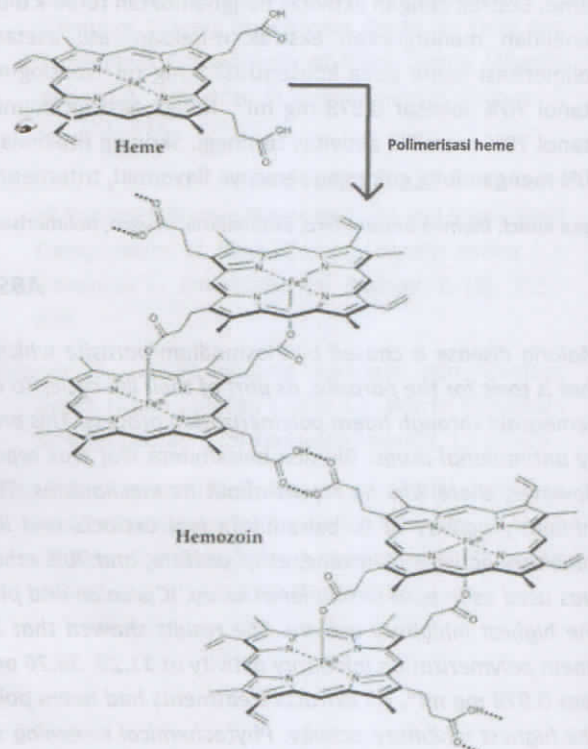
PENDAHULUAN

Penyakit malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* melalui vektor nyamuk *Anopheles* betina. Malaria masih merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia dengan hampir separuh populasi dunia yang beresiko terjangkit penyakit ini. Sekitar 300-500 juta kasus malaria telah dilaporkan di seluruh dunia dan lebih dari 1 juta orang meninggal tiap tahunnya (Murray *et al.* 2012). Parasit *Plasmodium* akan menyerang sel darah merah inangnya dan mendegradasi hemeoglobin dalam vakuola makanannya untuk mendapatkan senyawa-senyawa yang dibutuhkan selama fase hidupnya. Hasil degradasi hemeoglobin ini akan menghasilkan produk samping yaitu heme bebas yang toksik terhadap parasit maupun inangnya. Untuk mempertahankan hidupnya, parasit akan mengubah heme bebas tersebut menjadi hemozoin yang tidak toksik (Huy *et al.* 2007). Proses perubahan heme bebas menjadi hemozoin ini dikenal sebagai reaksi polimerisasi heme (Gambar 1). Perubahan heme menjadi hemozoin ini merupakan proses metabolisme yang eksklusif bagi parasit (Nagaraj *et al.* 2013). Oleh karena itu, penghambatan proses polimerisasi heme dapat dijadikan target kandidat obat antimalaria baru.

Sembung (*Blumea balsamifera*) adalah salah satu jenis tanaman obat yang umum digunakan oleh masyarakat di kawasan Asia Tenggara untuk mengobati batuk, demam dan influenza (daun), dan antiplasmodium (akar) (Noor Rain *et al.* 2007). Masyarakat Indonesia seperti di daerah Sei Kepayang, Sumatera Utara menggunakan rebusan daun sembung sebagai obat antimalaria (Abdillah *et al.* 2014). Abdillah *et al.* (2015) juga melaporkan bahwa ekstrak metanol daun sembung efektif membunuh parasit *Plasmodium falciparum* strain 3D7 penyebab penyakit malaria yang sensitif terhadap obat antimalaria klorokuin. Pengujian lanjutan secara *in vivo* terhadap mencit yang diinfeksi dengan parasit *P. falciparum* strain NK 65 memberikan hasil positif ekstrak daun

sembung sebagai obat antimalaria.

Penggunaan secara tradisional dan didukung oleh data ilmiah baik secara *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan bahwa daun sembung aktif sebagai obat antimalaria. Oleh karena itu, penelitian mengenai mekanisme aksi antimalaria terhadap parasit *Plasmodium* cukup penting untuk diteliti lebih lanjut. Beberapa pengujian mekanisme aksi antimalaria secara *in vitro* telah dilakukan diantaranya adalah metode penghambatan polimerisasi heme. Metode ini relatif mudah dilakukan dan memberikan hasil yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah (Saritha *et al.* 2015), walaupun pengujian penghambatan polimerisasi heme belum pernah dilakukan pada daun sembung. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun sembung dalam menghambat polimerisasi heme dan golongan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya.



Gambar 1. Proses perubahan heme bebas menjadi hemozoin (polimerisasi heme).

Figure 1. The conversion process of free haem into hemozoin (haem polymerization).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI tahun 2016. Percobaan meliputi ekstraksi daun sembung (*Blumea balsamifera*), skrining fitokimia ekstrak, dan uji *in vitro* anti-malaria dengan metode penghambatan polimerisasi heme.

Ekstraksi daun sembung

Daun sembung yang digunakan berasal dari tanaman yang sama berumur tujuh bulan yang dikeringkan di bawah sinar matahari. Setelah kering, sebanyak 500 g daun sembung diekstraksi bertingkat dengan cara dimaserasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol 70% (Gambar 2). Maserasi dengan masing-masing pelarut dilakukan sampai diperoleh filtrat hasil ekstraksi berwarna bening. Masing-masing ekstrak cair kemudian dipekatkan dengan penguap putar hampa udara (*rotary vacuum evaporator*) sampai didapatkan ekstrak kental, kemudian ditimbang untuk selanjutnya digunakan pada uji aktivitas antimalaria.



Gambar 2. Tanaman sembung yang digunakan sebagai bahan ekstraksi.

Figure 2. *B. balsamifera* leaves to be extracted.

Uji aktivitas antimalaria

Uji aktivitas antimalaria mengikuti metode Huy et al. (2007) yang dimodifikasi. Sebanyak 16,3 mg hemein klorida (SIGMA) dilarutkan dalam 1 ml dimetil sulfoksida (DMSO) lalu disaring dengan membran filter berdiameter 0,2 μm . Sebanyak 22,2 μl larutan hemein klorida dalam DMSO dilarutkan dengan buffer asetat 1 M (pH 4,8) sampai 5 ml. Larutan ini dipakai sebagai hemein uji. Sebanyak 20 μl larutan sampel berupa ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% dengan masing-masing konsentrasi akhir sebesar 1 mg ml^{-1} dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran. Kemudian ditambahkan sebanyak masing-masing 90 μl larutan hemein uji dan reaksi polimerisasi heme dimulai dengan menambahkan larutan Tween-20 (konsentrasi akhir 0,02 mg ml^{-1}). *Plate* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 250 menit untuk selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang 415 dan 630 nm menggunakan *microplate reader* (THERMO). Fraksi heme yang diubah menjadi β -hemeatin dihitung berdasarkan persamaan:

$$f = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{min}})$$

Keterangan/Note:

- A_{kontrol} = nilai serapan heme tanpa Tween-20 atau ekstrak daun sembung (*haem uptake value without Tween-20 or extract B. balsamifera*).
- A_{sampel} = serapan heme dengan penambahan Tween-20 dan ekstrak daun sembung (*haem uptake by the addition of Tween-20 and extract B. balsamifera*).
- A_{min} = serapan heme dengan penambahan Tween-20 tanpa ekstrak daun sembung (*haem uptake by the addition of Tween-20 without extract B. balsamifera*).

Persentase penghambatan pembentukan β -hemeatin oleh ekstrak daun sembung ataupun kontrol positif klorokuin sulfat dihitung berdasarkan persamaan:

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

Keterangan/Note:

f = fraksi heme yang diubah menjadi β -hemeatin (f = *haem fraction converted into β -hemeatin*).

Ekstrak dengan uji penghambatan terbaik pada konsentrasi bahan uji 1 mg ml^{-1} selanjutnya

diukur nilai IC_{50} (kadar senyawa yang mampu menghambat polimerisasi heme hingga 50%) dengan seri konsentrasi akhir sebesar 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 mg ml⁻¹ serta seri konsentrasi akhir klorokuin sulfat sebesar 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; dan 1 mg ml⁻¹. Nilai IC_{50} kemudian dihitung menggunakan analisis regresi linier.

Skrining fitokimia

Ekstrak yang mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi heme terbaik dilakukan skrining fitokimia secara kualitatif dengan metode Harborne (1998). Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan NH₄OH 25% dan kloroform ke dalam sampel. Filtrat berupa larutan organik diekstraksi dengan HCl pekat. Lapisan asam kemudian ditambah beberapa tetes pereaksi *Dragendorff*. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi *Dragendorff* menunjukkan adanya alkaloid.

Uji steroid/triterpenoid dilakukan dengan memamerasi sampel dengan eter selama dua jam, lalu disaring. Filtrat kemudian diuapkan dalam cawan penguap, kemudian ditambahkan asam asetat glasial dan satu tetes asam sulfat pekat pada residu. Terbentuknya warna merah, hijau ungu dan biru menunjukkan adanya kandungan steroid/triterpenoid.

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

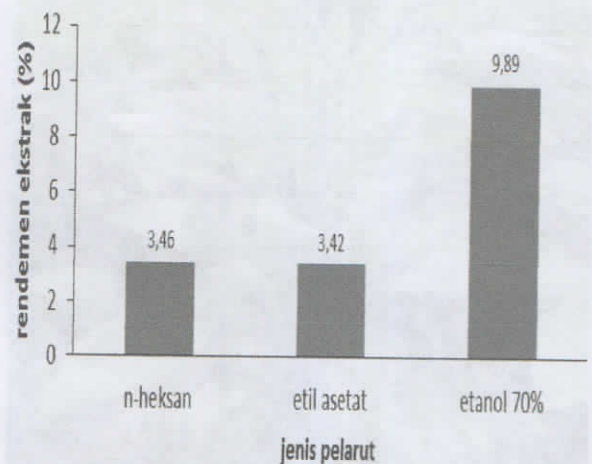
Pada uji flavonoid, saponin, tanin dan kuinon, sampel dididihkan dalam air panas selama lima menit, kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan serbuk magnesium, HCl pekat dan amil alkohol kemudian dikocok dengan kuat dan larutan dibiarkan memisah sesuai dengan pelarutnya. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga

pada lapisan alkohol. Tabung kedua dikocok dengan kuat secara vertikal. Larutan didiamkan selama 10 menit sampai terbentuk busa. Busa yang terbentuk dan tidak hilang setelah penambahan HCl 2N menunjukkan adanya kandungan saponin. Tabung ketiga ditambahkan larutan FeCl₃ 1%. Warna biru yang dihasilkan menunjukkan adanya kandungan tanin. Tabung keempat ditambahkan dengan NaOH 1N dan warna merah yang terbentuk menunjukkan adanya kuinon.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak

Rendemen ekstrak etanol 70% daun sembung memiliki persentase tertinggi yaitu sebesar 9,89% dibandingkan dengan ekstrak n-heksan (3,46%) maupun etil asetat (3,42 %) (Gambar 3). Tingginya rendemen yang didapatkan dari ekstrak etanol 70% disebabkan pelarut tersebut memiliki polaritas yang mirip dengan kebanyakan komponen kimia yang terkandung dalam jaringan tanaman. Etanol 70% dapat melarutkan komponen fitokimia secara maksimal karena kandungan air yang tinggi (30%) yang dapat membantu proses ekstraksi (Abdillah *et al.* 2015).



Gambar 3. Rendemen ekstrak daun sembung dengan tiga jenis pelarut.

Figure 3. The extract yield of *B. balsamifera* leaf using three types of solvents.

Aktivitas antimalaria

Hasil uji pendahuluan ekstraksi daun sembung dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% menunjukkan adanya aktivitas penghambatan polimerisasi heme dengan nilai penghambatan masing-masing sebesar 11,28; 26,26; dan 56,88%. Ekstrak etanol 70% memiliki aktivitas semakin banyak (Sembiring and Manoi 2011). penghambatan tertinggi. Hal ini dapat berhubungan dengan nilai rendemen ekstrak yang lebih tinggi, dimana semakin tinggi nilainya maka kemungkinan senyawa aktif yang dikandungnya. Ekstrak etanol 70% memiliki nilai penghambatan di atas 50% pada konsentrasi bahan uji 1 mg ml⁻¹. Penelitian antimalaria secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan menggunakan pelarut dengan kepolaran berbeda telah banyak dilakukan. Ekstrak etanol daun *Phyllanthus amarus* memberikan hasil yang lebih baik sebagai antimalaria dibandingkan dengan ekstrak air pada percobaan antiplasmodium secara *in vivo* (Nwazue et al. 2013). Pengujian antimalaria secara *in vitro* menggunakan fraksi etanol bawang putih memberikan aktivitas penghambatan polimerisasi heme lebih baik dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan etil asetat (Manu et al. 2013). Oleh karena itu, hanya ekstrak etanol 70% yang diuji lebih lanjut untuk menentukan daya penghambatan polimerisasi heme 50% (IC₅₀).

Hasil pengujian lanjutan menunjukkan ekstrak etanol 70% daun sembung memiliki nilai IC₅₀ sebesar 0,978 mg ml⁻¹, sedangkan kontrol positif yaitu klorokuin sulfat memiliki nilai IC₅₀ sebesar 0,668 mg ml⁻¹ (Tabel 1). Senyawa dengan IC₅₀ yang lebih kecil dari nilai IC₅₀ klorokuin sulfat yaitu 12 mg ml⁻¹, dapat dikategorikan memiliki aktivitas dalam menghambat polimerisasi heme (Baelmans et al. 2000). Berdasarkan hal tersebut, maka ekstrak etanol 70% daun sembung mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi heme walaupun masih di bawah kontrol positif klorokuin sulfat. Hal ini dapat terjadi karena ekstrak etanol 70% daun sembung masih mengandung beberapa senyawa, sedangkan klorokuin sulfat merupakan senyawa yang lebih murni. Aktivitas suatu senyawa campuran atau ekstrak kasar dapat lebih rendah dibandingkan dengan senyawa tunggal atau yang lebih murni karena dalam ekstrak kasar terdapat beberapa senyawa yang bersifat antagonistik terhadap senyawa lainnya (Rasoanaivo et al. 2011).

Pengujian antimalaria pada penelitian ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode penghambatan polimerisasi heme. Secara alami, parasit *Plasmodium* akan masuk ke dalam sel darah merah inangnya. Di dalam sel darah merah, parasit *Plasmodium* akan memecah hemeoglobin menjadi heme bebas dan asam-asam amino

Tabel 1. Nilai IC₅₀ ekstrak dengan aktivitas penghambatan polimerisasi heme tertinggi.

Table 1. The IC₅₀ value of extract with the highest haem polymerization inhibitory activity.

Sampel	Konsentrasi (mg ml ⁻¹)	Fraksi β-hematin	Penghambatan (%)	IC ₅₀ (mg ml ⁻¹)
Ekstrak etanol 70%	0,25	0,6402	35,98	0,978
	0,5	0,5765	42,35	
	1	0,4312	56,88	
	2	0,3282	67,18	
	4	0,2198	78,02	
Klorokuin sulfat	0,0625	0,8257	17,43	0,668
	0,125	0,7821	21,79	
	0,25	0,6670	33,30	
	0,5	0,4779	52,21	
	1	0,3966	60,34	

sebagai bahan dasar untuk kehidupan sel parasit. Hasil samping berupa heme bebas pada pemecahan hemeoglobin bersifat toksik bagi parasit maupun sel inang (Huy *et al.* 2007). Untuk menanggulangi hal itu, parasit akan mengubah heme bebas menjadi hemozoin yang tidak toksik melalui proses polimerisasi.

Skrining fitokimia

Dari hasil skrining fitokimia secara kualitatif didapatkan hasil ekstrak etanol 70% daun sembung mengandung senyawa flavonoid, steroid, tanin, kuinon, dan saponin (Tabel 2 dan Gambar 4). Beberapa penelitian sebelumnya

melaporkan adanya beberapa senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai antimalaria. Senyawa golongan saponin, tanin, flavonoid, steroid/triterpenoid, dan kuinon yang terdapat dalam ekstrak etanol 70% daun sembung dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai antimalaria (Lamidi *et al.* 1996; Kurosawa *et al.* 2000; Manu *et al.* 2013; Salenusu *et al.* 2014; Syamsudin *et al.* 2013).

Aktivitas antimalaria senyawa-senyawa tersebut dapat terjadi melalui beberapa mekanisme penghambatan diantaranya adalah menghambat polimerisasi heme. Sampai dengan saat ini belum ada informasi mengenai mekanisme senyawa golongan tanin dalam menghambat polimerisasi heme, tetapi senyawa polifenol yang lain selain tanin yaitu golongan flavonoid dilaporkan memiliki kemampuan dalam menghambat polimerisasi heme. Senyawa flavonoid akan bersinergi dengan artemisinin dari tanaman *Artemisia* dengan cara meningkatkan kemampuan pengikatan artemisinin dengan heme yang menyebabkan terbentuknya artemisinin peroksida yang memiliki efek antimalaria (Bilia *et al.* 2002).

Mekanisme saponin, yang termasuk golongan terpenoid, dalam penghambatan polimerisasi heme juga belum jelas. Meskipun demikian, senyawa golongan triterpenoid lainnya yaitu senyawa turunan asam ursolat dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme

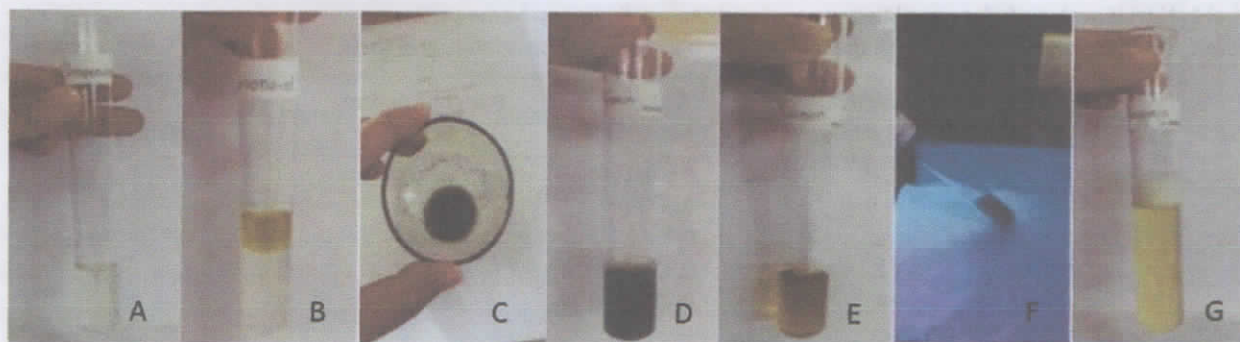
Tabel 2. Skrining fitokimia ekstrak daun sembung dengan aktivitas penghambatan polimerisasi hem tertinggi.

Table 2. Phytochemical screening of *B. balsamifera* leaf extract with the highest heme polymerization inhibitory activity.

No.	Senyawa	Ekstrak etanol 70%
1	Alkaloid	-
2	Flavonoid	+
3	Steroid/triterpenoid	+
4	Tanin	+
5	Kuinon	+
6	Kumarin	-
7	Saponin	+

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

Note : sign (+) containing the target compound, (-) does not contain the target compound.



Gambar 4. Skrining fitokimia ekstrak daun sembung dengan aktivitas penghambatan polimerisasi heme tertinggi (A = alkaloid; B = flavonoid; C = steroid/triterpenoid; D = tanin; E = kuinon; F = kumarin; G = saponin).

Figure 4. Phytochemical screening of *B. balsamifera* leaf extract with the highest haem polymerization inhibitory activity (A = alkaloids; B = flavonoids; C = steroids/triterpenoids; D = tannins; E = quinines; F = coumarins; G = saponins).

dengan cara membentuk kompleks dengan cincin karboksilat heme sehingga heme akan tetap berupa cincin dimer (Gnoatto et al. 2008). Selain itu, mekanisme golongan senyawa kuinon dalam menghambat polimerisasi heme juga belum diketahui, akan tetapi senyawa ini mempunyai aktivitas antimalaria dengan cara menghambat kerja enzim *glutathione reductase* pada parasit *Plasmodium* (Grellier et al. 2010).

KESIMPULAN

Ekstrak daun sembung memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme dengan aktivitas tertinggi terdapat pada ekstrak etanol 70% dengan kandungan senyawa kimia flavonoid, steroid/triterpenoid, tanin, kuinon, dan saponin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, S., Tambunan, R.M., Farida, Y., Sandhiutami, N.M.D. & Dewi, R.M. (2015) Phytochemical Screening and Antimalarial Activity of Some Plants Traditionally Used in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5 (6), 454–457.
- Abdillah, S., Tambunan, R.M., Sinaga, Y.M. & Farida, Y. (2014) Ethno Botanical Survey of Plants Used in the Traditional Treatment of Malaria in Sei Kepayang, Asahan of North Sumatera. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7, S104–S107.
- Baelmans, R., Deharo, E., Munoz, V., Sauvain, M. & Ginsburg, H. (2000) Experimental Condition for Testing the Inhibitory Activity of Chloroquine on the Formation of β -Hemeatin. *Experimental Parasitology*. 96 (4), 243–248.
- Billa, A.R., Lazari, D., Messori, L., Taglioli, V., Temperini, C. & Vincieri, F.F. (2002) Simple and Rapid Physico-Chemical Methods to Examine Action of Antimalarial Drugs with Hemein: Its Application to *Artemisia annua* Constituents. *Life Sciences*. 70 (7), 769–778.
- Gnoatto, S.C.B., Susplugas, S., Dalla Vecchia, L., Ferreira, T.B., Dassonville-Klimpt, A., Zimmer, K.R., Demailly, C., Da Nascimento, S., Guillon, J. & Grellier, P. (2008) Pharmacomodulation on the 3-acetylsulfonic acid skeleton: Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel N-[3-[4-(3-aminopropyl) piperazinyl]propyl]-3-O-acetylsulfonamide Derivates as Antimalarial Agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 16 (2), 771–782.
- Grellier, P., Marozienė, A., Nivinskas, H., Šarlauskas, J., Aliverti, A. & Čėnas, N. (2010) Antiplasmodial activity of Quinones: Roles of Aziridiny Substituents and the Inhibition of Plasmodium Glutathione Reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 494 (1), 32–39.
- Harborne, A.J. (1998) *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*.
- Huy, N.T., Uyen, D.T., Maeda, A., Oida, T., Harada, S. & Kamei, K. (2007) Simple Colorimetric Inhibition Assay of Heme Crystallization for High-Throughput Screening of Antimalarial Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (1), 350–353.
- Kurosawa, Y., Dorn, A., Kitsuji-Shirane, M., Shimada, H., Satoh, T., Matile, H., Hofheinz, W., Masciadri, R., Kansy, M. & Ridley, R.G. (2000) Hemeatin Polymerization Assay as a High-Throughput Screen for Identification of New Antimalarial Pharmacophores. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (10), 2638–2644.
- Lamidi, M., Ollivier, E., Gasquet, M., Faure, R., Nzé-Ekekang, L. & Balansard, G. (1996) Structural and Antimalarial Studies of Saponins from *Nauclea diderrichii* Bark. In: *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*, pp.383–399.
- Manu, S., Deshmukh, R., Prasad, K.M.N. & Trivedi, V. (2013) Screening and Characterization of Antimalarial Heme Polymerase Inhibitors from Garlic Cloves. *European Journal of Medicinal Plants*. 3 (3), 474.
- Murray, C.J.L., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R. & Lopez, A.D. (2012) Global Malaria Mortality Between 1980–2010: a Systematic Analysis. *The Lancet*. 379 (9814), 413–431.
- Nagaraj, V.A., Sundaram, B., Varadarajan, N.M., Subramani, P.A., Kalappa, D.M., Ghosh, S.K. & Padmanaban, G. (2013) Malaria Parasite-Synthesized Heme Is Essential in the Mosquito and Liver Stages and Complements Host Heme in the Blood Stages of Infection. *PLoS Pathog*. 9 (8), e1003522.
- Nwazue, N.R., Jacinta, O. & Wesley, B. (2013) *In Vivo* Antimalarial Effects of Ethanol and Crude Aqueous

Extracts of *Phyllanthus amarus*. *World Essays Journal*. 1 (4), 115–124.

Rain, A.N., Khozirah, S., Mohd Ridzuan, M.A., Ong, B.K., Rohaya, C., Rosilawati, M., Hamdino, I., Badrul, A. & Zakiah, I. (2007) Antiplasmodial Properties of Some Malaysian Medicinal Plants. *Tropical Biomedicine*. 24 (1), 29–35.

Rasoanaivo, P., Wright, C.W., Willcox, M.L. & Gilbert, B. (2011) Whole Plant Extracts Versus Single Compounds for the Treatment of Malaria: Synergy and Positive Interactions. *Malaria Journal*. 10 (1), S4.

Salenus, J., Wijaya, J., Labetubun, C.N. & Belseran, S.E. (2014) Potensi Ekstrak Heksan Daun Kapur (*Harmisipanax aculeatus*, Harms) Sebagai Obat

Antimalaria. *Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian*.

Saritha, M., Koringa, K., Dave, U. & Gatne, D. (2015) A Modified Precise Analytical Method for Anti-Malarial Screening: Heme Polymerization Assay. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 201 (2), 112–115.

Sembiring, B.B. & Manoi, F. (2011) Identifikasi Mutu Tanaman Ashitaba. *Bul Littro*. 22 (2). 177-185.

Syamsudin, Supargiyono, Wahyuono, S., Simanjuntak, P. & Mustofa (2013) Heme Polymerization Inhibitory Activities of Xanthone from *G. parvifolia* (Miq) Miq Stem Bark as an Antimalarial. *Asian Journal of Chemistry*. 25 (3), 1311.