



AKTIVITAS ANTIPLASMODIUM DAN SITOTOKSITAS FRAKSI POTENSIAL (FG2, FG3 DAN FG4) DARI DAUN KAPUR (*Harmsioplanax aculeatus*, Harms) YANG SECARA TRADISIONAL DIGUNAKAN UNTUK TREATMENT MALARIA DI MALUKU, INDONESIA

Activity of Anti-plasmodial and Cytotoxicity of Kapur Leaves (Harmsioplanax aculeatus, Harms) Potential Fraction (FG2, FG3 and FG4) Traditionally Used to Treat Malaria in Maluku Indonesia

Rachel Turalely^{1,2*}, Mustofa³, Mahardika Agus Wijayanti⁴, dan Triana Hertiani⁵

¹Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Pattimura, Ambon, Maluku, Indonesia

²Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

³Bagian Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁴Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁵Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Untuk korespondensi: No HP : 081381219402; e-mail : racheluralely.unpatti@gmail.com

Received: May 16, 2018

Accepted: August 15, 2018

Online Published: August 31, 2018

DOI : 10.20961/jkpk.v3i2.21068

ABSTRAK

Daun tanaman *Harmsioplanax aculeatus*, Harms yang secara lokal dinamakan tanaman kapur, telah digunakan secara tradisional sebagai tanaman obat untuk mengobati malaria di Maluku, Indonesia, meskipun bukti ilmiah senyawa aktif antimalaria dari tanaman ini belum diteliti. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas anti plasmodium dan sitotoksitas dari fraksi aktif daun *Harmsioplanax aculeatus*, Harms. Fraksi yang diuji adalah FG2, FG3 and FG4 yang diperoleh melalui pemisahan ekstrak metanol menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) secara bergradien menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform, etil asetat dan metanol. Aktivitas Antiplasmodium secara *in vitro* dievaluasi pada *Plasmodium falciparum* strain FCR3 yang resisten klorokuin menggunakan metode mikroskopik. Aktivitas sitotoksitas melawan sel vero dievaluasi menggunakan *MTT colorimetric method*. Aktivitas antiplasmodium dan sitotoksitas dihitung berdasarkan IC_{50} (*inhibitory concentration of 50% Plasmodium* atau sel vero yang tumbuh setelah diinkubasi dengan fraksi yang diujikan), kemudian dihitung menggunakan analisis regresi probit dengan SPSS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi FG2, FG3 dan FG4 mempunyai aktivitas antiplasmodium menjanjikan dengan nilai IC_{50} 7,48; 8,24 dan 7,75 $\mu\text{g/mL}$ secara berturut-turut. Aktivitas sitotoksitas fraksi FG2, FG3 dan FG4 pada sel vero adalah 5814,43; 7780,48 dan 1022,44 $\mu\text{g/mL}$ secara berturut-turut. Indeks selektivitas (IC_{50} sel vero/ IC_{50} *Plasmodium*) ketiga fraksi tersebut berturut-turut adalah 777,33; 944,23 dan 131,93. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga fraksi tersebut mempunyai aktivitas antiplasmodium, tidak toksik dan selektif melawan *P. falciparum*. Studi selanjutnya akan dilakukan isolasi senyawa aktif dari fraksi tersebut.

Kata Kunci: daun kapur, aktivitas antiplasmodium, sitotoksitas, malaria, tumbuhan obat

ABSTRACT

Harmsiopanax aculeatus, Harms, also known as *kapur*, have been traditionally used as medicinal plants to treat malaria in Maluku, Indonesia, although scientific evidence of the antimalarial active compounds of this plant has not been studied. This study was conducted to evaluate the anti-plasmodial and cytotoxicity activity of the active fraction of *H. aculeatus* leaves. The fractions tested were FG2, FG3 and FG4 obtained by separation of methanol extract using Vacuum Liquid Chromatography (VLC) by gradually using n-hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol solvents. Anti-plasmodial activity in vitro was evaluated in *Plasmodium falciparum* strain FCR3 which is chloroquine resistant using microscopic method. The activity of cytotoxicity against vero cells was evaluated using MTT colorimetric method. The anti-plasmodial activity and cytotoxicity were expressed by IC₅₀, inhibitory concentration of 50% *Plasmodium* or cells growth after incubation with the fraction tested, which calculated using probit regression analysis with SPSS. The results showed that the fraction of FG2, FG3 and FG4 had a promising anti-plasmodial activity with IC₅₀ value of 7.48; 8.24 and 7.75 µg/mL, respectively. The cytotoxicity activity of the three fractions on vero cell were 5814.43; 7780.48 and 1022.44 µg/mL, respectively. Moreover, the selectivity index (IC₅₀ Vero cells/IC₅₀ *Plasmodium*) of those were 777.33, 944.23 and 131.93, respectively indicated that the three fractions were active, non-toxic and selective against *P. falciparum*. Further study will be conducted to isolate the active compounds of the fraction.

Keywords: *kapur* leaves, antiplasmodium activity, cytotoxicity, malaria, medicinal plants

PENDAHULUAN

Plasmodium merupakan salah satu jenis parasit yang dapat menginfeksi manusia terutama yang hidup di daerah tropis maupun sub tropis. *Plasmodium* yang terinfeksi tubuh manusia dapat menyebabkan penyakit malaria yang berbahaya bahkan dapat menyebabkan kematian. Lima jenis *Plasmodium* yang menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* dan *Plasmodium knowlesi* [1].

Saat ini, secara global malaria belum dapat dituntaskan sehingga menjadi pusat perhatian di dunia. Menurut laporan WHO tahun 2015, adanya 212 kasus malaria baru pada tahun 2015 dan diperkirakan ada 429.000 kematian akibat malaria (kisaran 235.000-639.000) di seluruh dunia. Sebagian besar kematian ini terjadi di Afrika (92%), di Asia Tenggara (6%) dan di Mediterania Timur (2%). Tahun 2010 sampai 2015 jumlah kasus

malaria mengalami penurunan hingga 21% karena adanya berbagai tindakan preventif dan pengobatan yang dilakukan. Namun tiap tahunnya jumlah kasus malaria baru pun masih tetap ada [2].

Salah satu kendala malaria belum dapat dituntaskan adalah adanya resistensi *Plasmodium* terhadap obat malaria yang selama ini digunakan. Penggunaan artemisinin dan semisintetik derivatnya (artesunat, artemeter dan dihidroartemisinin) yang telah direkomendasikan WHO untuk mengobati malaria pengganti klorokuin dan beberapa obat antimalaria lainnya seperti meflokuin, kuinin, proguanil, atovakuin, dan sulfadoksin-pirimetamin pun sudah resisten sejak tahun 2000 [3]. Artemisinin diketahui merupakan suatu dimensi baru untuk terapi malaria yang dapat mengeliminasi semua fase aseksual *Plasmodium* sekaligus membunuh perkembangan gametosit *Plasmodium* [4]. Namun saat ini penggunaan artemisinin dan kom-

binasnya (ACTs atau Artemisinin Combination Therapies) telah dilaporkan juga mengalami resistensi. Resistensi *Plasmodium* terhadap artemisinin pertama kali dilaporkan di Asia Tenggara dimulai dari Propinsi Pailin, Bagian Barat Kamboja sejak tahun 2009 [5-9].

Adanya tingkat kesakitan dan kematian yang sangat tinggi sebagai akibat dari resistensi terhadap obat antimalaria, telah mendorong upaya dari berbagai pihak seperti akademisi maupun industri farmasi untuk melakukan terobosan dalam menemukan obat baru. Salah satu upaya untuk penemuan obat malaria baru adalah dengan teknik *screening* bahan alam yang memiliki aktivitas biologis dan terapi terutama bahan alam yang secara etnofarmakologi yang sudah digunakan sebagai obat tradisional anti-malaria oleh masyarakat endemis malaria [5].

Salah satu tanaman tradisional yang digunakan oleh masyarakat Maluku, Indonesia untuk mengobati malaria adalah *Harmsioplanax aculeatus*, Harms. Tanaman ini secara lokal disebut tanaman kapur. Keunikan dari pengobatan malaria menggunakan daun tanaman *H. aculeatus* dibandingkan dengan cara pengobatan malaria secara tradisional lainnya lainnya di Indonesia maupun di berbagai negara endemis malaria adalah perasan daun kapur yang sudah dibersihkan, ditetaskan pada mata penderita [10].

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kapur memiliki aktivitas antiplasmodium secara *in vivo* (ED_{50} = 16,16 mg/kgBB) dan secara *in vitro* (IC_{50} =14,22 μ g/mL) [10]. Beberapa fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol daun kapur telah diujikan aktivitasnya. Fraksi FG8 dari

ekstrak metanol menghambat aktivitas polimerisasi hem dengan IC_{50} sebesar 18,22 μ g/mL [10]. Fraksi larut kloroform etil-asetat (FG5) dan Fraksi larut metanol (FG12) juga memiliki aktivitas antiplasmodium *in vitro* dengan nilai IC_{50} berturut-turut 3,24 μ g/mL dan 3,88 μ g/mL [11-12]. Fraksi larut *n*-heksan (FG1) ekstrak metanol dilaporkan memiliki aktivitas antiplasmodium lemah yaitu sebesar 76,92 μ g/mL menurut kategori Gessler et al (1994) dalam [13]. Tetapi berdasarkan penelitian yang lain FG1 dikategorikan tidak aktif [14]. Beberapa fraksi lain hasil pemisahan ekstrak metanol daun kapur, belum pernah dilaporkan aktivitas biologisnya seperti antiplasmodium dan sitotoksitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antiplasmodium dan sitotoksik Fraksi FG2, FG3 dan FG4 ekstrak daun kapur (*H. aculeatus*), sehingga dapat menjadi acuan untuk penelusuran lebih lanjut senyawa aktif antimalaria dari daun kapur (*H. aculeatus*).

METODE PENELITIAN

1. Alat utama

Seperangkat alat *vakum liquid chromatography* (VLC), mikroskop, Inkubator CO₂, mikroskop inverter, *Laminary Air Flow*, evaporator, *vacuum pump*, *Elisa Reader*.

2. Kimikali

Etil asetat, *n*-heksan, etil asetat dan metanol, kloroform berderajat analisis. silica gel 40 Merck (37-50 mesh), silika gel 60H (1105932), Giemsa, minyak emersi, media komplit RPMI, media komplit M199, MTT.

3. Koleksi material tanaman dan ekstraksi

Sampel daun kapur (*H.aculeatus*) diambil dari desa Amahai, Kecamatan Amahai, Kabupaten Maluku Tengah, Maluku, Indonesia. Determinasi dilakukan di Laboratorium Taksonomi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

Ekstraksi simplisia daun kapur (*H.aculeatus*) dilakukan dengan teknik maserasi bertingkat menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol kemudian di evaporasi sehingga diperoleh ekstrak kental.

4. Fraksinasi ekstrak metanol daun kapur

Ekstrak metanol sebanyak 10 gram yang telah diimpregnasi dengan silika gel 40 Merck (37-50 mesh), difraksinasi menggunakan *vacuum liquid chromatography* (VLC). Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60H (1105932) sebanyak $\frac{3}{4}$ kolom. Elusi dilakukan secara bergradien dimulai dengan heksan, kloroform, etil asetat dan metanol dengan berbagai perbandingan Fraksi yang diperoleh, dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi dengan profil KLT yang mirip digabung. Fraksi FG2, FG3 dan FG4 yang diperoleh selanjutnya diujikan aktivitas antiplasmodium dan sitotoksik.

5. Uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* fraksi FG2, FG3 dan F4

Kultur *P. falciparum* strain resisten klorokuin (FCR3) dikerjakan dengan metode *candle jar* [15] yang dimodifikasi. Pembiakan sel darah merah yang terinfeksi dilakukan dalam *culture flask* yang berisikan 8 mL media komplit (yang mengandung 10% serum). Kultur dimanipulasi secara aseptis di

dalam *laminary flow cabinet*. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 37°C di dalam inkubator CO₂. Pada tahap pengujian, volume akhir suspensi untuk kontrol dan perlakuan pada tiap sumuran yang diujikan yaitu sebanyak 100 µL media komplit (berisikan parasit *Plasmodium* yang telah disinkronisasikan dengan sorbitol 5%) dengan hematokrit 3% dan parasitemia 2% pada tiap sumuran. Bahan uji (FG2, FG3 dan FG4) sebanyak 5 mg dilarutkan dengan 100 µL (kurang dari 5%) DMSO, kemudian ditambahkan RPMI sampai volume 5,2 mL sebagai larutan stok. Selanjutnya dibuatkan seri konsentrasi untuk tiap bahan uji (FG2, FG3 dan FG4) didalam *well* yaitu 400, 200, 50, 25, 5, 1 µg/mL dan dibuat triplikat. *Mikroplate* diletakkan di dalam kotak desikator hampa udara dengan memakai lilin (*candle jar*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam di dalam inkubator CO₂. Setiap sampel dibuat apusan darah tipis setelah inkubasi berakhir. Pewarnaan apusan dilakukan menggunakan giemsa dan selanjutnya secara visual parasitemia dihitung menggunakan mikroskop. IC₅₀ *Plasmodium* ditentukan berdasarkan perhitungan menggunakan analisis regresi probit dengan SPSS.

6. Uji sitotoksitas fraksi FG2, FG3 dan FG4

Sifat sitotoksitas bahan uji diujikan pada sel vero. Sel vero yang inaktif ditumbuhkan sampai konfluen (80%). Penentuan toksisitas bahan uji dilakukan dengan cara 100 µl sel dengan kepadatan 2x10⁴ sel/sumuran dimasukkan kedalam *microplate* 96 sumuran. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu 37°C setelah pencucian pertama

dengan 100 μ L PBS dalam 100 μ l media kultur yang mengandung 5 mg/mL garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid). Selanjutnya diberikan *reagen stopper* 100 μ L SDS 10% dalam HCl 0,1N dan diinkubasi pada suhu kamar semalam dalam ruang gelap. Absorbansi tiap sumuran diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan ELISA reader. IC₅₀ sel vero dihitung dengan analisis regresi probit menggunakan SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi ekstrak metanol daun kapur menggunakan VLC diperoleh 12 fraksi. Fraksi tersebut diperoleh setelah monitoring profil KLT. Fraksi FG2 larut dalam *n*-heksan 100%, FG3 larut dalam *n*-heksan: kloroform (7:3) dan FG4 larut dalam *n*-heksan: kloroform (3:7). Ketiga fraksi tersebut kemudian diuji aktivitas antiplasmodium secara *in vitro* pada *Plasmodium falciparum* strain FCR3. Data aktivitas penghambatan pertumbuhan *Plasmodium* diperlihatkan seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Persentase Penghambatan Pertumbuhan *Plasmodium* dan IC₅₀ *Plasmodium* Fraksi FG2, FG3, FG4

Fraksi	Persentase Tiap Konsentrasi Fraksi (%) \pm SD (n=3)						IC ₅₀ (μ g/mL)
	400 (μ g/mL)	200 (μ g/mL)	50 (μ g/mL)	25 (μ g/mL)	5 (μ g/mL)	1 (μ g/mL)	
FG2	89,67 \pm 0,72	87,85 \pm 1,04	56,79 \pm 0,15	51,07 \pm 1,06	42,56 \pm 1,33	41,00 \pm 1,39	7,48
FG3	94,47 \pm 1,16	92,2 \pm 1,53	64,07 \pm 0,92	51,33 \pm 1,30	40,33 \pm 0,19	34,70 \pm 0,47	8,24
FG4	81,61 \pm 0,79	66,47 \pm 2,10	56,27 \pm 1,56	51,40 \pm 0,82	47,95 \pm 0,55	43,86 \pm 0,48	7,75

SD= standar deviasi; n= pengulangan tiap konsentrasi bahan uji.

Data pada Tabel 1, menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi bahan uji, semakin rendah pula persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium*. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi bahan uji yang diberikan, maka semakin besar pula pertumbuhan *Plasmodium* dihambat. Demikian pula nilai IC₅₀ *Plasmodium* semakin kecil. Semakin kecilnya nilai IC₅₀, semakin baik pula aktivitas bahan uji tersebut. Aktivitas antiplasmodium bahan alam dikategorikan sebagai berikut: aktivitas tinggi bila IC₅₀ < 5 μ g/mL, aktivitas menjanjikan jika IC₅₀ = 5-15 μ g/mL, aktivitas moderat jika IC₅₀ = 15-50 μ g/mL dan tidak aktif jika IC₅₀ > 50 μ g/mL [14]. Berdasarkan kategori tersebut,

FG2, FG3 dan FG4 memiliki aktivitas menjanjikan sehingga berpotensi untuk dikembangkan dalam pencarian dan penemuan senyawa aktif antimalaria.

Meskipun FG2, FG3 dan FG4 memiliki aktivitas menjanjikan sebagai antiplasmodium, namun informasi tentang tingkat keamanan ketiga fraksi tersebut terhadap sel normal perlu diketahui. Pada penelitian ini, ketiga fraksi tersebut telah diujikan aktivitas sitotoksitas terhadap sel vero yang merupakan sel normal pada mamalia (sel epidermis pada ginjal monyet hijau). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga fraksi tersebut memiliki nilai IC₅₀ > 1000 μ g/mL seperti yang diperlihatkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Data IC₅₀ Sel Vero Fraksi FG2, FG3 dan FG4

Fraksi	IC ₅₀ Sel Vero (µg/mL)
FG2	5814,43
FG3	7780,48
FG4	1022,44

Data ini menunjukkan bahwa diantara ketiga fraksi tersebut, FG3 memiliki IC₅₀ terbesar yang berarti bahwa sel vero mampu tumbuh hingga 50% ketika diberi fraksi FG3. Hal ini memperlihatkan bahwa FG3 memiliki sifat tidak toksik terhadap sel mamalia. Demikian halnya dengan FG2 dan FG4 tidak toksik terhadap sel mamalia walaupun memiliki kemampuan yang lebih rendah dibandingkan dengan FG3. Ketiga fraksi tersebut dikategorikan aman (tidak toksik) karena memiliki IC₅₀ > 30 µg/mL [3].

Berdasarkan data IC₅₀ *Plasmodium* (Tabel 1) dan IC₅₀ sel vero (Tabel 2) ketiga fraksi tersebut, maka dapat ditentukan nilai indeks selektivitas. Nilai indeks selektivitas ketiga fraksi tersebut ditentukan dari rasio IC₅₀ sel vero terhadap IC₅₀ *Plasmodium* seperti diperlihatkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Indeks Selektivitas Fraksi FG2, FG3 dan FG4

Fraksi	Indeks Selektivitas
FG2	777,33
FG3	944,23
FG4	131,93

Berdasarkan data pada Tabel.2, FG2, FG3 dan FG4 memiliki nilai indeks selektivitas > 100. Hal ini menunjukkan

bahwa ketiga fraksi tersebut selektif melawan *Plasmodium falciparum* penyebab malaria. Itu berarti bahwa FG2, FG3 dan FG4 berpotensi dikembangkan lebih lanjut untuk mencari dan menemukan senyawa aktif antiplasmodium.

Jika dibandingkan dengan fraksi FG5 dan FG12 ekstrak metanol daun kapur (*H. aculeatus*) dalam penelitian sebelumnya [11-12], kemampuan FG2, FG3, dan FG4 masih rendah. Namun demikian, berdasarkan data hasil penelitian ini, FG2, FG3 dan FG4 memiliki *range* nilai IC₅₀ *Plasmodium*, IC₅₀ sitotoksik dan indeks selektivitas yang dikategorikan menjanjikan dan tidak toksik serta selektif melawan *P. falciparum* sehingga berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut untuk menemukan senyawa aktif antiplasmodium dari ketiga fraksi tersebut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi FG2, FG3 and FG4 mempunyai aktivitas antiplasmodium menjanjikan dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 7,48 µg/mL; 8,24 µg/mL dan 7,75 µg/mL.
2. Fraksi FG2, FG3 dan FG4 tidak toksik (aman) terhadap sel mamalia dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 5814,43 µg/mL; 7780,48 µg/mL dan 1022,44 µg/mL.
3. Fraksi FG2, FG3 dan FG4 selektif melawan *P. falciparum* dengan nilai indeks selektivitas berturut-turut 777,33; 944,23 dan 131,93.
4. Studi selanjutnya akan dilakukan isolasi senyawa aktif dari fraksi tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada pihak Kementerian Ristek RI yang telah membiayai penelitian ini melalui dana Insinas Ristek.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] E. Salas-Sarduy *et al.*, "Antiparasitic effect of a fraction enriched in tight-binding protease inhibitors isolated from the Caribbean coral *Plexaura homomalla*," *Exp. Parasitol.*, vol. 135, no. 3, pp. 611–622, 2013.
- [2] World Health Organization, *World Malaria Report*, vol. WHO/HTM/GM, no. December. 2015, p. 238.
- [3] R. S. O. Nondo *et al.*, "Anti-plasmodial activity of Norcaesalpin D and extracts of four medicinal plants used traditionally for treatment of malaria," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [4] P. B. Memvanga, G. L. Tona, G. K. Mesia, M. M. Lusakibanza, and R. K. Cimanga, "Antimalarial activity of medicinal plants from the Democratic Republic of Congo: A review," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 169, pp. 76–98, 2015.
- [5] T. N. C. Wells, R. H. Van Huijsduijnen, and W. C. Van Voorhis, "Malaria medicines: A glass half full?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 14, no. 6, pp. 424–442, 2015.
- [6] R. M. Fairhurst, "Purpose of review—The emergence of artemisinin resistance in Southeast Asia, where artemisinin combination therapies (ACTs) are beginning to fail, threatens global endeavors to control and eliminate *Plasmodium falciparum* malaria. Future efforts to prevent," *Curr Opin Infect Dis*, vol. 28, no. 5, pp. 417–425, 2016.
- [7] R. M. Fairhurst and A. M. Dondorp, "Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria," *Microbiol Spect*, vol. 11, no. 4, pp. 1–14, 2016.
- [8] C. J. Woodrow and N. J. White, "The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 41, no. 1, pp. 34–48, 2017.
- [9] A. A. Lover, R. Gosling, R. Feachem, and J. Tulloch, "Eliminate now: Seven critical actions required to accelerate elimination of *Plasmodium falciparum* malaria in the Greater Mekong Subregion," *Malar. J.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [10] R. Turalely, R. A. Susidarti, and M. A. Wijayanti, "In vivo Antiplasmodial of the Most Active Fraction and Its Compound of Kapur Leaves (*Harmsioplanax aculeatus* Harms) Extract Against *Plasmodium berghei*," *Trop. Med. J.*, vol. 1, no. 2, pp. 131–140, 2011.
- [11] R. Turalely and F. Mahulete, "Kajian Aktivitas Antiplasmodium In Vitro dan Aktivitas Sitotoksik Fraksi 5 (Fg5) Ekstrak Metanol Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms)," in *Prosiding Insinas Ristek 2014*, 2014.
- [12] R. Turalely, "Uji Aktivitas Antiplasmodium Fraksi 12 (Fg12) Ekstrak Metanol Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms)," *Molluca J. Chem. Educ.*, vol. 12, no. 2, pp. 1–5, 2015.
- [13] R. Turalely, "Uji Aktivitas Antiplasmodium Fraksi 1 (Fg1) Ekstrak Metanol Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms)," *Molluca J. Chem. Educ.*, vol. 1, no. 2, pp. 8–13, 2014.
- [14] M. C. Jonville *et al.*, "Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 120, pp. 382–386, 2008.
- [15] W. Trager and J. B. Jensen, "Human malaria parasites in continuous culture," *Science*, vol. 193, no. 4254, pp. 673–5, 1976.