**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI PROFILAKSIS INFEKSI Plasmodium berghei PADA MENCIT**

Mokhammad Faisol A., Ardiana Ekawanti, E.Hagni Wardoyo

**Background**. Nigella sativa is a traditional herb that has many effects, one of which is the effect of antimalarial. Malaria was disease caused by a parasite of Plasmodium sp. This research’s objective was to know the effects of Nigella sativa as prhophylaxis agent for P. berghei infection on mice.

**Method**. This research was an experimental research. The method used was post test control group design by means of providing treatment from the first day until seventh. The population of this research was BALB/C mice. Samples were selected by simple random sampling that divided into three groups (nine mice in each group). One group as control positive group given chloroquine with dose 10 mg/KgBW, one group as control negative group given aquadest, and the other one group as group of treatment given extract Nigella sativa with dose 3 µl/gramBW. The extract given for seven days then activity was evaluated on fourth, fifth, sixth, seventh, and eighth days. In every twenty four hours after the administration of the last dose, thin blood films were made from the tail of each mouse. Smears stained with Giemsa stain. The percentage of parasitaemia was determined by counting the number of parasitized erythrocytes out of 1000 red blood cells in random fields under light microscope. And then countinued by counting percentage of parasitaemia suppression.

**Result**. Supression of parasitemia in each group at eighth day was 0% in negative control group, 80,65% in positive control group, and 71,84% in treatment group. Results of Mann Whitney test, there were no difference between the positive control group and the treatment group with a value of significance (p=0,085) on eighth days.

**Conslusion**. The influence of Nigella sativa extract could improved suppression of parasitemia reach 71,84% on mice that infected by Plasmodium berghei, Although not higher than group given chloroquine

**Abstrak**

**Latar belakang.** *Nigella sativa* merupakan tanaman tradisional yang memiliki banyak efek, salah satunya adalah efek antimalaria. Malaria adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh parasit dari genus *Plasmodium.* Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* sebagai profilaksis terhadap hambatan parsitemia pada mencit yang diinfeksikan *Plasmodium berghei.*

**Metode.** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Metode yang digunakan adalah *post test control design* yaitu dengan cara memberikan perlakuan dari hari pertama hingga ke tujuh. Populasi penelitian ini adalah mencit putih. Sampel dipilih secara *simple random sampling* dibagi menjadi tiga kelompok dimana tiap kelompok terdapat sembelian ekor mencit. Pada penelitian ini satu kelompok sebagai kelompok kontrol positif hanya diberi klorokuin dengan dosis 10 mg/KgBB, satu kelompok kontrol negatif yang diberi aquades, dan satu kelompok perlakuan diberi ekstrak *Nigella sativa*  dengan dosis 3µl/gramBB. Setiap hari dimulai hari ke-4 sampai hari ke-8 dilakukan pengambilan darah tepi untuk menghitung parasit yang diamati dari preparat hapusan darah tepi dan menentukan hambatan parasitemia.

**Hasil.** Daya hambat parasitemia masing-masing kelompok pada hari kedelapan berturut-turut adalah 0% pada kelompok kontrol negatif, 80,65% pada kelompok kontrol positif, dan 71,84% pada kelompok perlakuan. Terlihat bahwa daya hambat parasitemia tertinggi sampai terendah berturut-turut adalah kelompok kontrol positif dengan nilai hambat 80,65%, kelompok perlakuan dengan nilai hambat 71,84%, dan kelompok kontrol positif dengan nilai hambat 0%. Pada uji *Mann Whitney* menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan dengan nilai signifikansi pada hari kedelapan (p=0,085).

**Simpulan.** Meskipun tidak lebih tinggi dibandingkan kelompok yang diberikan klorokuin, pemberian ekstrak *Nigella sativa* sebagai profilaksis dengan dosis 3µl/gramBB memiliki hambat parasitemia mencapai 71,84%.

**Kata kunci:** Antimalaria, profilaksis, *Nigella sativa, P. berghei.*

**PENDAHULUAN**

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit Plasmodium yang hidup dan berkembang biak dalam sel darah merah manusia. Penyakit ini secara alami ditularkan melalui gigitan nyamuk Anopheles betina.6 Malaria masih merupakan penyakit endemis di Indonesia dan 50% penduduk masih tinggal di daerah endemik malaria. Data tahun 2007 menunjukkan adanya peningkatan kasus malaria secara signifikan dari 1,8 juta kasus pada tahun 2006 menjadi 2,5 juta kasus. Untuk meningkatkan upaya pengendalian malaria di Indonesia, pada tahun 2000 Menteri Kesehatan mencanangkan Gerakan Berantas Malaria (Gebrak Malaria) melalui tiga strategi, yaitu mengontrol vektor malaria, mengembangkan pemakaian obat antimalaria untuk pencegahan dan pengobatan, serta mengembangkan vaksin malaria.5

Menurut Depkes RI (2013), salah satu tantangan terbesar dalam upaya [pengobatan malaria](http://www.indonesian-publichealth.com/2013/02/pengobatan-malaria.html) di Indonesia adalah terjadinya penurunan efikasi pada penggunaan beberapa obat antimalaria, bahkan terdapat resisten terhadap obat klorokuin. di Indonesia pertama kali kasus resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin ditemukan di Kalimantan Timur. Kemudian resistensi itu meluas ke seluruh propinsi dengan derajat resistensi yang bervariasi. Berdasarkan evaluasi obat antimalaria di Indonesia dilaporkan resistensi tersebut sudah ditemukan di dua puluh propinsi. Kasus resistensi *P. falciparum* terhadap sulfadoksin pirimetamin dilaporkan di sebelas propinsi. Evaluasi in vitro resistensi *P. falciparum* terhadap kina ditemukan di enam propinsi, terhadap mefloquin di lima propinsi dan resistensi terhadap amodiaquin di empat propinsi. Resistensi *P.vivax* terhadap klorokuin telah dilaporkan di Sumatra Utara (Pulau Nias 13%), Irian jaya (4 1%), NTT (8%), Sulawesi Utara (2%).

Penyebaran yang luas dan cepat parasit malaria akibat resistensi di hampir semua daerah endemik mendorong peneliti untuk menemukan obat anti malaria yang baru, dengan melakukan penelitian tanaman obat, seperti biji dari tanaman jintan hitam.

Beberapa penelitian terhadap jintan hitam yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian minyak *Nigella sativa* dapat menurunkan parasitemia mencit Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.8 Tunru dkk (2012) dalam penelitiannya ekstrak biji *N. sativa* dengan pelarut air dapat menurunkan jumlah *P. berghei* NK65 dan menurunkan kadar NO pada hewan coba pada dosis yang digunakan. Pemberian ekstrak biji *N. sativa* dengan pelarut air pada dosis 100 µg/kgBB memberikan efek relatif lebih baik terhadap kelangsungan hidup mencit yang diinfeksi *P. berghei* NK65 dibanding dosis lain. *N. sativa* dapat menghambat jumlah parasit dan kadar NO. NO dapat berfungsi sebagai anti parasit pada kadar tertentu, apabila kadarnya terlalu kecil fungsi sebagai antiparasit tidak optimal, namun jika kadarnya terlalu tinggi akan bersifat merusak karena sifat radikal bebasnya.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti berkeinginan untuk meneliti pengaruh pemberian ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) sebagai profilaksis infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit.

**METODE PENELITIAN**

**Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental laboratoris dengan desain penelitian eksperimental *post test only control group design.* Sampel dari penelitian ini adalah mencit Balb/c dewasa usia 8-12 minggu, jenis kelamin jantan, berat badan 15-30 gram, dan dengan kondisi fisik yang sehat. Setelah dirandomisasi mencit dibagi menjadi tiga kelompok, dengan rumus federer setiap kelompok terdiri dari delapan ekor dengan faktor koreksi 50% setiap kelompok menjadi 9 ekor.

Setelah randomisasi, sejak hari pertama hingga hari ketujuh setiap kelompok diberikan perlakuan. Pada kelompok perlakuan (P), mencit diberikan ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 3 ml/kgBB. Kelompok kontrol positif (K+) diberikan klorokuin 10 mg/kgBB, sedangkan kelompok kontrol negatif (K-) diberikan aquadest. Ekstrak yang digunakan diberikan menggunakan pelarut ethanol dengan metode maserasi.

**Pengumpulan Data**

Sejak hari keempat hingga hari kedelapan data dikumpulkan dengan menghitung persen hambat parasitemia dari hapusan darah yang diambil dari ekor tikus menggunakan pewarnaan giemsa. Hambatan parasitemia dapat diukur dengan rumus:

Tingkat parasitemia (%) =

Keterangan:

dx : rerata tingkat parasitemia pada hari ke-x

n : jumlah hari perlakuan

Parameter yang diukur adalah banyaknya eritrosit yang terinfeksi pada semua stadium malaria dalam 1000 eritrosit.

**Analisis Data**

Data hasil penelitian yang diperoleh terdistribusi tidak normal sehingga analisis data yang digunakan adalah analisis non parametrik yaitu dengan uji *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

**HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

**Hasil Penelitian**

Rerata tingkat parasitemia terendah pada hari kedelapan setelah perlakuan terdapat pada kelompok kontrol positif (K+) yaitu sebesar 1,43% dan tertinggi pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu 7,26%. Sedangkan pada kelompok perlakuan memiliki rerata tingkat parasitemia sebesar 2,14%.

Pada hari kelima sampai pada hari kedelapan setelah pemberian ekstrak, hambat parasitemia tertinggi terdapat pada kelompok kontrol positif (K+) secara berturut-turut sebesar 58,27%, 62,25%, 66,90%, dan 80,65%. Sedangkan pada kelompok perlakuan memiliki hambat parasitemia sebesar 46,51%, 47,32%, 50,61%, dan 71,84% secara berturut-turut.

Gambar 1. Grafik persentase hambat parasitemia ekstrak biji jintan hitam

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap hambatan parasitemia *Plasmodium berghei* pada masing-masing kelompok pada hari kelima, keenam, ketujuh, dan kedelapan setelah perlakuan, dilakukan analisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* yang hasilnya terdapat pada tabel dibawah ini :

Tabel 1. Pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap persen hambat parasitemia pada *P.berghei* masing-masing kelompok pada hari kelima sampai kedelapan

|  |  |
| --- | --- |
| **Hari Perlakuan** | **Nilai p** |
| Hari 5 | 0,017 |
| Hari 6 | 0,001 |
| Hari 7 | 0,003 |
| Hari 8 | 0,000 |

Berdasarkan hasil analisis data hambat parasitemia dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, terdapat perbedaan yang bermakna pada hari kelima sampai hari kedelapan dengan nilai signifikansi <0,05.

Meskipun terdapat perbedaan bermakna antara tiap kelompok namun belum dapat ditentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna dengan yang lainnya sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* yang menunjukkan pada hari kedelapan kelompok perlakuan memiliki nilai signifikansi p=0,085 (p>0,05) sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif (K+).

Untuk mengetahui mengetahuui kekuatan hubungan antara kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan terhadap terjadinya nilai hambat lebih dari 50% dilakukan pengukuran *Odd Ratio* yang hasilnya terdapat pada tabel dibawah ini :

Tabel 2. Hasil pengukuran *Odd Ratio* kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dari hari kelima hingga hari kedelapan.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nilai | | |
| Jintan | Rasio hambatan >50% | 47% |
|  | Rasio hambatan <50% | 53% |
| Kontrol Positif | Rasio hambatan >50% | 69% |
| Rasio hambatan <50% | 31% |
| OR J | CI 95% (0,156-1,080) | 0,41 |
| OR K | CI 95% (0,929-6,421) | 2,44 |
| Peluang | | |
| Jintan | Terjadinya Hambatan >50% | 0,28 |
| Klorokuin | Terjadinya Hambatan >50% | 0,70 |

**Keterangan :** OR J: *Odd Ratio* Jintan; OR K: *Odd Ratio* Klorokuin.

Pada Tabel di atas didapatkan jintan memiliki rasio hambatan parasitemia >50% sebesar 47%. Sedangkan pada kelompok kontrol positif memiliki rasio hambatan parasitemia >50% sebesar 60%. Pada kelompok jintan memiliki peluang terjadinya hambatan >50% adalah 0,28. Pada kelompok klorokuin memiliki peluang terjadinya hambatan >50% adalah 0,70. Hasil *Odd Ratio* menunjukkan bahwa jintan memiliki efek hambatan >50% sebesar 0.45 kali dibandingkan dengan klorokuin. Sedangkan klorokuin memiliki hambatan parasitemia >50% sebesar 2.44 kali dibandingkan jintan.

**Pembahasan**

Menurut Rinidar et al (2013) menyatakan bahwa suatu bahan dapat dikatakan memiliki efek antiplasmodial apabila dapat menghambat parasitemia lebih atau sama dengan 50%. Pada penelitian ini dari hari ketiga hingga hari ke empat dapat menghambat parasitemia lebih dari 50% dengan nilai hambat tertinggi pada kelompok perlakuan pada hari ke empat yaitu 71,84%. Menurut Abdulellah et al (2007) menyatakan bahwa terapi antimalaria menggunakan ekstrak *Nigella* *sativa* dapat meningkatkan hambatan parasitemia mencit pada hari ke empat sebesar 70,69 %. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan *Nigella* *sativa* sebagai profilaksis dan terapi empirik memiliki efek hambatan parasitemia yang sama yaitu, sekitar 70%.

Berdasarkan hasil analisis data hambat parasitemia dengan menggunakan test Kruskal Wallis, terdapat perbedaan yang bermakna antara tiap kelompok. Pada hari kelima hingga hari kedelapan terdapat perbedaan hambat parasitemia yang bermakna antara setiap kelompok dengan nilai berturut-turut (p=0,017) pada hari kelima, (p=0,001) pada hari keenam, (p=0,003) pada hari ketujuh, dan (p=0,000) pada hari kedelapan. Meskipun memiliki perbedaa antara setiap kelompok, belum dapat diketahui kelompok manakah yang memiliki perbedaan yang bermakna. Sehingga, dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan atau memiliki efek yang sama antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif atau negatif.

Berdasarkan hasil uji Mann Whitney didapatkan pada hari kelima hingga hari kedelapan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan yang signifikan (p<0,005), sedangkan pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan pada hari kelima hingga kedelapan memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai signifikansi berturut-turut (p=0,310) pada hari kelima, (p=0,310) pada hari keenam, (p=0,627) pada hari ketujuh, dan (p=0,085) pada hari kedelapan. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memiliki efek profilaksis antiplasmodial yang setara dengan kelompok kontrol positif yang diberikan klorokuin 10mg/kgBB.

Meskipun *Nigella sativa* memliki efek profilaksis yang setara dengan klorokuin, rasio hambatan parasitemia >50% pada *Nigela sativa* masih dibawah klorokuin dengan nilai rasio sebesar 47%, sedangkan pada klorokuin memliki rasio hambatan parasitemia >50% sebesar 69%. Berdasarkan tabel hasil pengukuran Odd Ratio menunjukkan bahwa *Nigella sativa* memiliki efek hambatan >50% sebesar 0.45 kali dibandingkan dengan klorokuin, sedangkan klorokuin memiliki hambatan parasitemia >50% sebesar 2,44 kali lebih besar daripada Nigella. Hal ini menunjukkan bahwa obat klorokuin masih lebih baik dalam menghambat parasitemia dibandingkan dengan ekstrak *N. sativa.*

Efek profilaksis dari *N. sativa* disebabkan karena telah terjadi penghambatan pertumbuhan parasit pada fase eritrosit sehingga dengan penghambatan tersebut dapat mengurangi tingkat parasitemia yang terus meningkat. Berdasarkan penelitian mengenai malaria dewasa ini diketahui bahwa salah satu senyawa aktif yang memiliki efek antimalaria pada jintan hitam (*Nigella sativa*) adalah flavonoid, thymoquinone dan mempengaruhi (*Nitric Oxide*) NO.

Senyawa flavonoid di ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) telah diketahui dapat memblok sintesis protein pada *Plasmodium* sehingga *Plasmodium* tidak dapat menjalankan proses biokimiawi dengan baik di dalam tubuhnya.14

Akrom (2012) menyatakan pada penelitiannya bahwa timokuinon, nigelon dan asam lemak tak jenuh adalah kandungan yang terdapat pada biji jintan hitam yang bersifat antioksidatif, kemopreventif dan imunomodulator. Timokuinon sebagai immunodulator dapat menjadi penghambat metabolisme arakidonat, mempengaruhi aktivasi efektor dan limfosit T-Helper. Pemberian ekstrak biji jintan hitam pada limfosit dan sel mononuclear secara in vitro dapat meningkatkan produksi interleukin-1b dan TNFα tetapi menurunkan produksi interleukuin-4 dan interleukin-8, meningkatkan aktivitas CD4 dan kadar IFNγ, menurunkan aktivitas sel NK, dan meningkatkan aktivitas fagositosis.

**KESIMPULAN DAN SARAN**

**Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* sebagai profilaksis terhadap hambatan parasitemia *Plasmodium berghei* pada mencit Balb/C, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Nigella sativa* pada dosis 3 µl/gramBB mencit dapat menjadi profilaksis infeksi *P. berghei* pada mencit Balb/c.

**Saran**

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* sebagai profilaksis terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit, maka disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian dosis profilaksis dapat mencegah kejadian kerusakan hepar dan malaria cerebral yang ditimbulkan oleh *Plassmodium*. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang profilaksis malaria dengan dosis bertingkat untuk mengetahui *effective dose* dan *letal dose.* Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme *Nigella sativa* mempengaruhi metabolisme *Nitric Oxide* (NO) terhadap aktivitas makrofag. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang perbandingan antara pemberian *Nigella sativa* dan klorokuin yang sudah resisten terhadap efek antimalaria.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Abdulelah, HAA & Zainal-Abidin, BAH 2007, ‘In Vivo Anti-malarial Tests of Nigella sativa (Black Seed) Different Extracts’, *American Journal of Pharmacology and Toxicology,* vol.2, no.2, pp. 46-50.
2. Akrom 2012, *Mekanisme Kemopreventif Ekstrak Heksan Biji Jinten Hitam (Nigella Sativa Lor) Pada Tikus Sprague Dawley Diinduksi 7,12 Dimethylbenz(A)Antracene: Kajian Antioksidan Dan Imunomodulator,* Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada : Yogyakarta.
3. Al-Hijazi, A. Y. And Mohammed, H.S., 2013, *Evaluation of the Effect of Nigella Sativa Oil and Powder on Socket Healing Process,* Journal of Natural Sciences Research, Vol.3, No.11, 2013.
4. Arsin, AA 2012, *Malaria di Indonesia Tinjauan Aspek Epidemiologi*, Makassar : Masagena Press.
5. Darlina, 2012, *RESPONS HEMATOPOITIK MENCIT YANG DIINFEKSI DENGAN Plasmodium berghei STADIUM ERITROSITIK IRADIASI GAMMA,* FMIPA Biologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
6. Depkes RI, 2011,*Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia,*Gebrak Malaria: Jakarta.
7. Depkes RI 2013, *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan Epidemiologi Malaria di Indonesia*, Available from : <http://www.depkes.go.id/downloads/publikasi/buletin/BULETIN%20MALARIA.pdf> Acessed at 16-11-13.
8. Diajeng, A.H., 2011, *Pengaruh Pemberian Minyak Jintan Hitam (Nigella sativa) Dosis Bertingkat Terhadap Parasitemia Mencit Balb-C Yang Diinfeksi Plasmodium berghei*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro : Semarang.
9. Hosseinzadeh, H., Bazzaz, B.S.F., and Haghi, M.M.,2007, *Antibacterial Activity of Total Extracts and Essential Oil of Nigella sativa L. Seeds in Mice,* Pharmacologyonline 2: 429-435
10. Kesmas, 2012, *Resistensi Plasmodium terhadap Obat Anti Malaria*, Available on <http://www.indonesian-publichealth.com/2013/02/resistensi-obat-malaria.html> accessed at 17 Jan 2014
11. Lehane, A.M. and Saliba,K.J.,2008, *Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite*, BMC Research Notes, Vol.1, No.26, June 2008, Available on <http://download.springer.com/static/pdf/321/art%253A10.1186%252F1756-0500-1-26.pdf?auth66=1391045555_a722e79a8697f1acb0f9a8b0e16b1da5&ext=.pdf>, accessed at 29 Jan 2014.
12. LUMC, 2013, *Morphology P. berghei: light microscospy*,available on https://www.lumc.nl/con/1040/81028091348221/810281121192556/811070740182556/811070750432556/ accessed at 12 Jan 2013
13. LUMC, 2013, *Life cycle of P. berghei*, available on<https://www.lumc.nl/con/1040/81028091348221/810281121192556/811070740182556/811070747452556/>accessed at 12 Jan 2013
14. Mikhail, O.N., Abdulsalam, T.A., and Akanji, M.A., 2013*, Phytochemical Analysis and Antimalarial Activity Aqueous Extract of Lecaniodiscus cupanioides Root*, Journal of Tropical Medicine, Article ID 605393, Available on : <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2013/605393/>, Accessed at 29 Jan 2013.
15. Sulmaz, J. and Elenaz, J., 2012, *The study of pharmacologic and medicinal valuation of thymoquinone of oil of Nigella sativa in the treatment of diseases,* Annals of Biological Research, 2012, 3 (4):1953-1957. Available on : <http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol3-iss4/ABR-2012-3-4-1953-1957.pdf>, accessed at 29 Jan 2013.
16. Tunru, S.I., Linda, W & Etty,W, 2012, ‘*Anti-Malaria Study of Nigella sativa L. Seed Water Extract in Mus musculus Mice Balb C Strain In Vivo’*, Makara Journal of Science*,* vol.16, no.3, pp. 192-6.
17. Tamad, F.S.U. dkk, 2011, *Gambaran Histopatologi Hepatosit Tikus Putih Setelah Pemberian Jintan Hitam Dosis 500mg/Kgbb, 1000mg/Kgbb, Dan 1500mg/Kgbb Selama 21 Hari (Subkronik),* Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman, Vol 5, No. 3, September 2011.
18. Utami W.S, Nuri, and Armiyanti ,Yunita, 2012, *Effect Tithonia Diversifolia ((Hemley) A. Gray) Ethanol Extract As Antimalarial On Mice Strain Balb / C Before And After Infected By Plasmodium berghei,* Jember University, Faculty of Medicine, Jember : Jurnal Medika, Vol. 1, No. 5, April 2012
19. WHO 2012, *Profile Country Malaria*, <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_country_profiles.pdf>. Accessed at 16-11-12
20. WHO, 2011, *World report malaria 2011* *Summary and Key,* Available from Points<http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/wmr2011_summary_keypoints.pdf>, Accessed at 16-11-12.