

Penelitian

# Ekstrak Metanol Cengkeh (*Syzygium Aromaticum* (L.) Merry & Perry) Varietas Tuni Buru Selatan sebagai Antimalaria

(Methanol Extract of Cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merry & Perry)  
of Tuni Buru Selatan Varieties as Antimalarial)

Dharmawaty M. Taher<sup>1</sup>, Dedy Duryadi Solihin<sup>1\*</sup>, Umi Cahyaningsih<sup>2</sup>, Purwantiningsih Sugita<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan  
Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Departemen Kimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

\*Penulis untuk korespondensi: [dduryadi@yahoo.com](mailto:dduryadi@yahoo.com)

Diterima 24 Januari 2018, Disetujui 14 Juni 2018

## ABSTRAK

Malaria masih menjadi salah satu masalah kesehatan di dunia dan Indonesia. Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merry & Perry) adalah tanaman asli Indonesia yang berpotensi sebagai fitofarmaka. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis aktivitas antimalaria *in vitro*, uji toksisitas, dan uji penghambatan secara *in vivo* ekstrak metanol cengkeh varietas Tuni Buru Selatan. Konsentrasi uji *in vitro* bunga, tangkai bunga, dan daun cengkeh masing-masing adalah 0,01, 0,1, 1, 10, dan 100 µg/mL duplo. Dosis uji toksisitas bunga cengkeh dan tangkai bunga cengkeh masing-masing 625, 1250, 2500, 5000, dan 10000 mg/kg BB dan lima ulangan. Uji *in vivo* dengan menggunakan tiga dosis perlakuan bunga cengkeh dan tangkai bunga cengkeh masing-masing 25, 50, dan 100 mg/kg BB dan 5 ulangan. Hasil uji *in vitro* menunjukkan 50% *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ) bunga cengkeh 1,25 µg/mL; tangkai bunga cengkeh 7,89 µg/mL dan daun cengkeh 11,42 µg/mL; 50% *Lethal doses* ( $LD_{50}$ ) bunga cengkeh 19743,327 dan tangkai bunga cengkeh 47304,436 mg/kg BB; Persentase penghambatan rata-rata uji *in vivo* bunga cengkeh 94,19; 95,81; 78,28% dan tangkai bunga cengkeh 90,48; 80,43; 74,14%. Ekstrak metanol cengkeh varietas Tuni Buru Selatan berpotensi sebagai antimalaria dan tidak toksik.

**Kata kunci:** cengkeh, Tuni Buru Selatan, antimalaria

## ABSTRACT

Malaria is still one of the health problems in the world and Indonesia. Clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merry & Perry) is an indigenous plant from Indonesia that has potential as a phytopharmaca. The objectives of the study were to analyze the *in vitro* antimalarial activity, toxicity test and *in vivo* inhibition test of methanol extract of cloves from tuni Buru Selatan varieties. The concentration of *in vitro* test of flower, flower stalks, and leaf of cloves were 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL duplo respectively. The doses of toxicity test of cloves flower and cloves flower stalk were 625, 1250, 2500, 5000, and 10000 mg/kg BW and five replications respectively. The *In vivo* test using three treatment doses of cloves flower and cloves flower stalks were 25, 50, and 100 mg/kg BW and five replications respectively. The results of *in vitro* test show 50% *Inhibitory Concentration* ( $IC_{50}$ ) of cloves flower was 1.25 µg/mL; cloves flower stalk was 7.89 µg/mL and cloves leaf was 11.42 µg/mL; 50% *Lethal doses* ( $LD_{50}$ ) of cloves flower was 19743,327 and cloves flower stalk was 47304,436 mg/kg BW; *in vivo* average inhibition percentage of cloves flower were 94,19; 95,81; 78,28% and cloves flower stalk were 90,48; 80,43; 74,14%. Methanol extract of cloves of Tuni Buru Selatan varieties have the potential as antimalarial and are not toxic.

**Keywords:** clove, Tuni Buru Selatan, antimalarial

## PENDAHULUAN

Pada tahun 2016, diperkirakan sebanyak 216 juta kasus malaria terjadi di seluruh dunia. Dibandingkan dengan tahun 2015, diperkirakan 5 juta kasus malaria lainnya telah terjadi secara global di tahun 2016 (WHO, 2017). Data malaria di Indonesia tahun 2015, angka *Annual Parasite Incidence* (API) tertinggi masih berada di wilayah timur Indonesia (KEMENKES RI, 2016). Permasalahan dalam penanggulangan malaria secara kimiawi mencakup tiga hal yaitu timbulnya resistensi obat antimalaria (WHO, 2015), panjangnya masa dormansi *Plasmodium falciparum* yang dapat mencapai jangka waktu selama lebih dari satu dekade yaitu sekitar 13 tahun (Ashley & White, 2014) dan belum ditemukannya vaksin antimalaria yang efektif. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, salah satu upaya penanggulangan yang penting dilakukan adalah menemukan senyawa baru antimalaria dari bahan tanaman potensial seperti cengkeh.

Indonesia merupakan negara asal cengkeh, yang memiliki empat varietas cengkeh unggul yaitu cengkeh varietas afo, Gorontalo, tuni Buru Selatan dan varietas Karo Medan. Keunggulan cengkeh ini adalah pada aspek produksinya yang tinggi dan daya tahan terhadap hama dan penyakit (Bursatriannyo, 2015, 2017; PUSLITBANGBUN, 2017; BALITTRO, 2017). Potensi ketahanan terhadap hama dan penyakit pada tanaman berkorelasi dengan produksi senyawa metabolit sekunder, yang berimplikasi pada manfaatnya sebagai fitofarmaka (Wink, 2015).

Ekstrak metanol cengkeh berpengaruh sebagai antimikroba dan mengatasi beberapa jenis penyakit telah dilaporkan antara lain: Dua et al. (2014) mengemukakan konsentrasi hambat minimum terhadap bakteri *E. coli* adalah 3,9 mg/mL, *P. aeruginosa* 1,95 mg/mL dan *S. aureus*, dan *B. pumilus* 0,98 mg/mL; Mirpour et al. (2015) menyatakan penghambatan pertumbuhan bakteri mulut dengan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC) *Streptococcus mutans* PTCC 1683 adalah 1,5 mg/mL dan 3 mg/mL dan *Streptococcus salivarius* PTCC 1448 adalah 6,25 mg/mL dan 12,5 mg/mL, Nilai  $IC_{50}$  untuk antikanker usus besar 31 µg/mL, antikanker payudara 29,7 µg/mL dan anti-kanker hati 18,7 µg/mL; Abd El Azim et al. (2014) mengemukakan ekstrak metanol cengkeh mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat melawan 2, 2-difenil-1-pikrylhydrazyl (DPPH) dibandingkan dengan vitamin C; Agen anti-cholinesterase untuk menanggulangi penyakit Alzheimer (Dalai et al., 2014). Pengujian ekstrak metanol cengkeh sebagai antimalarial belum banyak

dilaporkan. Bagavan et al. (2011) mengemukakan ekstrak etil asetat bunga cengkeh *S. aromaticum* terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 mempunyai  $IC_{50}$  13 µg/mL dan ekstrak metanol  $IC_{50}$  6.25 µg/mL. Pengujian aktivitas antimalaria menggunakan cengkeh dari varietas unggul Indonesia pada bagian bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh belum pernah dilakukan. Tangkai bunga dan daun cengkeh adalah produk cengkeh yang murah harganya dibandingkan dengan bunga cengkeh yang ketika tidak diolah oleh petani untuk dijual, cenderung menjadi limbah. Upaya memanfaatkan limbah pertanian menjadi produk yang bermanfaat sebagai bahan obat antimalaria bagi masyarakat menjadi bagian dari target penelitian ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis aktivitas antimalaria secara *in vitro*, uji toksisitas dan uji penghambatan secara *in vivo* ekstrak metanol cengkeh varietas Tuni Buru Selatan.

## BAHAN DAN METODE

### Penyiapan Sampel Cengkeh

Cengkeh varietas tuni Buru Selatan berasal dari wilayah Provinsi Maluku Kabupaten Buru Selatan Indonesia. Bagian cengkeh yang digunakan sebagai bahan uji adalah bunga, tangkai bunga dan daun.

### Pembuatan Ekstrak Metanol Cengkeh

Pembuatan ekstrak cengkeh menggunakan pelarut metanol 70% destilasi. Penggunaan pelarut metanol dan metode ekstraksi cengkeh mengacu pada cara kerja yang dikemukakan oleh Lin et al. (2016); Dua et al. (2014); Eloff (1998) dengan beberapa modifikasi. Sampel cengkeh berupa bunga, tangkai bunga (kering matahari selama 5-7 hari) dan daun (serasah) dihaluskan sampai berukuran 60-70 mesh selanjutnya disebut simplisia. Sebanyak 2 kg simplisia disuling untuk diukur kadar minyak atsiri, dan sebanyak 1300-1700 g diekstraksi. Proses ekstraksi dimulai dengan merendam simplisia ke dalam pelarut metanol 70% dengan perbandingan 1:10, selama proses perendaman dilakukan pengadukan sampel. Selanjutnya, penyaringan larutan dilakukan setiap tiga hari, kemudian simplisia direndam kembali menggunakan metanol, demikian seterusnya hingga proses penyaringan dilakukan sebanyak tiga kali. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *rotary-evaporator* hingga semua pelarut telah menguap dan akhirnya membentuk pasta. Pasta tersebut yang kemudian disebut ekstrak metanol yang siap untuk diuji.

### Uji *In vitro* terhadap *P. falciparum*

Uji *in vitro* mengacu pada cara kerja yang dikemukakan oleh Nondo et al. (2016); Murthihapsari et al. (2013); Inbaneson et al. (2012); Azas et al. (2002). Pengujian menggunakan ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh. Selain itu, uji *in vitro* juga menggunakan eugenol sintetis (*references compound*) CAS-No: 97-53-0 Merck KgaA, 64271 Darmstadt sebagai pembanding. Kultur *P. falciparum* dipelihara dan diuji di laboratorium uji Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya Indonesia.

Pembuatan kultur *P. falciparum* dilakukan menurut metode Trager & Jensen (1976). Secara singkat, stok sampel disiapkan menggunakan DMSO (DMSO konsentrasi akhir <0,5%) dan diencerkan dengan media lengkap (RPMI 1640 dilengkapi dengan plasma manusia 10%, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) sampai konsentrasi akhir sampel di sumur pelat kultur adalah 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/mL duplo. Klon parasit malaria *P. falciparum* disebarkan di 24-well culture plates. Pertumbuhan parasit dipantau dengan cara membuat ulas darah dengan pewarnaan Geimsa (1:10) mL. Aktivitas antimalaria masing-masing senyawa dinyatakan sebagai nilai IC<sub>50</sub> yang didefinisikan sebagai konsentrasi senyawa yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan parasit sebesar 50% dibandingkan dengan kontrol yang tidak diobati.

Persentase penghambatan pertumbuhan dinyatakan menurut persamaan berikut:

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\Sigma \text{ eritrosit yang terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus :

$$\text{Parasitemia (dx - dx-1)} = \% \text{ parasitemia hari ke-x} \\ \text{dikurangi \% parasitemia hari sebelumnya.}$$

Persentase penghambatan dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 - \left( \frac{\text{Parasitemia perlakuan}}{\text{Parasitemia kontrol negatif}} \times 100\% \right)$$

### Uji Toksisitas (LD<sub>50</sub>) ekstrak metanol cengkeh

Uji toksisitas cengkeh mengacu pada cara kerja yang dikemukakan oleh Liu et al. (2015); Vijayasteltar et al. (2016) dengan beberapa modifikasi. Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui dosis uji yang aman

bagi pengujian di tahap selanjutnya yaitu uji aktivitas antimalaria secara *in vivo*. Sampel ekstrak cengkeh yang digunakan adalah bunga dan tangkai bunga cengkeh karena mempunyai aktivitas antimalaria tergolong baik sampai sedang pada hasil uji secara *in vitro*. Ekstrak daun cengkeh mempunyai aktivitas lemah sehingga tidak dilanjutkan lagi pengujiannya pada tahap uji toksisitas.

### Preparasi Hewan Coba

Metode dan prosedur untuk preparasi hewan coba pada uji toksisitas dan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* dilakukan di laboratorium uji dan dibawah pengawasan Rumah Sakit Hewan Pendidikan (RSHP) Fakultas Kedokteran Hewan IPB dan telah mendapat sertifikat persetujuan etik hewan dari Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan IPB (SKEH) nomor: 060/KEH/SKE/V/2017 tanggal 3 Mei 2017.

Mencit jantan strain *Deutschland, Denken and Yoken (DDY)* sebanyak 30 ekor yang memiliki berat 20-25 g berumur 1,5-3 bulan dipelihara dalam kandang yang cukup untuk 5 ekor mencit. Pemberian pakan berupa pellet dan minuman secara tanpa batasan (*ad libitum*).

Sebelum pengujian, mencit diadaptasi pada kandang selama 2 x 24 jam. Mencit-mencit tersebut diaklimatisasi terlebih dahulu dengan pemberian obat cacing. Jenis obat untuk aklimatisasi adalah flagyl dosis 10 mg/kg BB rute oral dengan frekuensi pemberian 1 kali sehari.

Perlakuan dalam pengujian toksisitas menggunakan ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh dosis 625, 1250, 2500, 5000, dan 10000 mg/kg BB. Dosis perlakuan ditentukan berdasarkan standar LD<sub>50</sub> pada mencit *via* oral yaitu 2500 mg/kg BB (Tanko et al., 2008; European Medicine Agency, 2011). Setelah perlakuan, setiap hari dilakukan dua kali pengamatan terhadap jumlah mencit yang mati untuk perhitungan nilai LD<sub>50</sub>. Pengamatan terhadap mencit dilakukan selama 20 hari.

### Uji *In vivo* ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh terhadap *Plasmodium berghei*

Uji *in vivo* ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh terhadap *P. berghei* mengacu pada cara kerja yang dikemukakan oleh Muti'ah et al. (2016); Bankole et al. (2016); Fentahun et al. (2017) dengan beberapa modifikasi. Mencit (25-40 g) berumur 2.5-3 bulan diinfeksi *P. berghei* secara *intra-peritoneal* dengan dosis 1x10<sup>6</sup>/mL/ekor.

Dosis perlakuan parasit ditentukan mula-mula dengan menghitung presentasi parasit dari ulas darah mencit terinfeksi yang diwarnai giemsa yaitu jumlah parasit dibagi jumlah eritrosit. Jumlah eritrosit dihitung menggunakan *Improved Neubauer Counting Chamber* dengan membandingkan jumlah eritrosit dengan *volume counted* (0,02) lalu dikalikan dengan pengencer (200) per  $\mu\text{L}$ . Dosis parasit diperoleh dari hasil kali presentasi parasit dengan jumlah eritrosit yang telah dihitung dan dikonversikan menjadi per mL.

Ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh diberikan secara *oral* satu kali sehari setelah mencit diinfeksi menggunakan sonde lambung selama empat hari berturut-turut. Perlakuan ekstrak cengkeh menggunakan tiga dosis yaitu 25, 50 dan 100 mg/kg BB. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit sebagai ulangan dan 1 kelompok tambahan sebagai kontrol negatif (CMC Na 5%) sehingga total mencit yang digunakan adalah 20 ekor mencit.

Ulas darah dilakukan dengan cara pengambilan darah dari ekor (*vena coccigea*) mencit sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Persentase parasitemia *P. berghei* dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1000 eritrosit di bawah mikroskop. Data persentase penghambatan terhadap parasit hari ke-1 sampai hari ke-4 setelah infeksi diperoleh dari data persen pertumbuhan hari ke-x dikurangi persen pertumbuhan pada hari sebelumnya ( $H_x - H_{x-1}$ ).

Persentase parasitemia dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\sum \text{eritrosit yang terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus:

$$\text{Parasitemia } (dx - dx-1) = \% \text{ parasitemia hari ke-x} \\ \text{dikurangi } \% \text{ parasitemia hari sebelumnya.}$$

Persentase penghambatan dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 - \left( \frac{\text{Parasitemia perlakuan}}{\text{Parasitemia kontrol negatif}} \times 100\% \right)$$

### Analisis Kandungan Eugenol dan Minyak Atsiri Cengkeh

Analisis kandungan eugenol ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh dilakukan dengan metode GC-MS di laboratorium JICA Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) Bandung.

Analisis kandungan minyak atsiri bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh dilakukan di laboratorium uji Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) Bogor. Simplisia cengkeh diuapkan melalui proses destilasi uap selama 7-9 jam. Hasil analisis berupa minyak atsiri dibandingkan dengan bobot awal sehingga diperoleh kadar persentase minyak atsiri.

### Uji Fitokimia Cengkeh

Metode pengujian mengacu pada cara kerja uji menurut Harborne (1987), menggunakan ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh. Uji dilakukan laboratorium kimia organik IPB meliputi uji kualitatif flavonoid, fenol, alkaloid, saponin, tanin, triterpenoid, dan steroid.

### Analisis data

Nilai  $IC_{50}$  dan uji toksisitas (jumlah mencit yang mati) ditentukan dengan analisis probit menggunakan program SPSS 17- System. Analisis data uji *in vivo* menggunakan *Analysis of Variance (ANOVA)* yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan perlakuan yang diberikan (Gomez & Gomez, 1995).

## HASIL

Hasil uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* menunjukkan ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh mempunyai nilai penghambatan ( $IC_{50}$ ) terhadap *P. falciparum* kategori baik sampai menengah sedangkan ekstrak metanol daun cengkeh kategori aktivitas antimalaria tergolong lemah.

Hasil uji *in vitro* eugenol sintesis terhadap *P. falciparum* menunjukkan nilai aktivitas antimalaria termasuk kategori lemah, sama dengan kategori antimalaria pada daun cengkeh. Nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh, dapat dilihat pada Tabel 1.

Kategori aktivitas antimalaria berdasarkan nilai  $IC_{50}$  merujuk pada kategori suatu senyawa ekstrak pada uji *in vitro* menurut Rasoanaivo *et al.* (2004) yaitu aktivitas antimalaria sangat baik jika nilai  $IC_{50} < 0.1 \mu\text{g/mL}$ , aktivitas baik  $IC_{50} 0.1-1.0 \mu\text{g/mL}$ , aktivitas baik sampai menengah  $IC_{50} > 1.0-10 \mu\text{g/mL}$ , aktivitas lemah  $IC_{50} > 10-25 \mu\text{g/mL}$ , aktivitas sangat lemah  $IC_{50} 25-50 \mu\text{g/mL}$  dan termasuk kategori tidak aktif jika nilai  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ .

Hasil uji toksisitas ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh menunjukkan nilai  $LD_{50}$

Tabel 1 Nilai  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh varietas Tuni Buru Selatan

Bagian Cengkeh	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Bunga	1,25
Tangkai bunga	7,89
Daun	11,42
Eugenol sintetis	21,56

Tabel 2 Hasil Uji Toksisitas ( $LD_{50}$ ) Ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh

Ekstrak Metanol Cengkeh	Dosis uji (mg/kg BB)	Log Dosis	Tingkat Mortalitas	Ratio Mortalitas	% Mortalitas	$LD_{50}$
Bunga	625	2,796	0	0/5	0	19743,327
	1250	3,097	0	0/5	0	
	2500	3,398	0	0/5	0	
	5000	3,699	1	1/5	20	
	10000	4	1	1/5	20	
Tangkai Bunga	625	2,796	0	0/5	0	47304,436
	1250	3,097	0	0/5	0	
	2500	3,398	0	0/5	0	
	5000	3,699	0	0/5	0	
	10000	4	1	1/5	20	

berada pada kategori tidak toksik. Hasil uji toksisitas ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh disajikan pada Tabel 2.

Hasil uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* menunjukkan nilai persentase penghambatan ekstrak metanol bunga cengkeh lebih tinggi dibanding tangkai bunga cengkeh terhadap *P. berghei*. Hasil analisis sidik ragam terhadap persentase parasitemia menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan ekstrak metanol bunga cengkeh dengan tangkai bunga cengkeh pada berbagai dosis yang diaplikasikan. Perlakuan ekstrak metanol bunga cengkeh lebih baik dibandingkan ekstrak tangkai bunga cengkeh dilihat dari tingkat persentase parasitemia yang menunjukkan nilai sama bahkan lebih tinggi dibandingkan perlakuan dari ekstrak bunga cengkeh termasuk pada dosis ekstrak yang rendah. Persentase parasitemia ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh sebagaimana tersaji pada Tabel 3.

Hasil analisis ragam pada ekstrak metanol bunga maupun tangkai bunga cengkeh mempunyai kecenderungan menekan pertumbuhan *P. berghei* pada dosis yang rendah (25 mg/kg BB). Pada hari ke-1 perlakuan ekstrak metanol bunga cengkeh berbeda nyata lebih rendah tingkat parasitemianya dibandingkan semua dosis perlakuan. Pada hari ke-2 sampai hari ke-4, semua dosis perlakuan baik bunga maupun tangkai bunga cengkeh berbeda nyata lebih rendah persentase parasitemianya dibandingkan

kontrol negatif. Ekstrak metanol bunga cengkeh pada hari ke-3 dan hari ke-4 dengan dosis perlakuan 25 dan 50 mg/kg BB berbeda nyata lebih rendah tingkat parasitemia dibandingkan dosis perlakuan 100 mg/kg BB. Ekstrak metanol tangkai bunga cengkeh hari ke-4, dosis 50 mg/kg BB nyata berbeda lebih rendah dibandingkan dengan dosis 25 dan 100 mg/kg BB. Perlakuan ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh pada dosis rendah cenderung mampu menekan pertumbuhan *P. berghei* yang ditandai dengan penurunan tingkat parasitemia.

Persentase penghambatan ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh terhadap *P. berghei* hari ke-1 sampai hari ke-4 sebagaimana tersaji pada Tabel 4.

Hasil analisis kandungan eugenol dan minyak atsiri ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh menunjukkan bahwa ekstrak daun cengkeh memiliki kandungan eugenol tertinggi dibandingkan berturut-turut tangkai bunga dan bunga cengkeh. Persentase minyak atsiri tertinggi terdapat pada tangkai bunga dibandingkan berturut-turut bunga dan daun cengkeh. Hasil analisis Kandungan eugenol ekstrak dan minyak atsiri simplisia bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh sebagaimana tersaji pada Tabel 5.

Hasil analisis kandungan fitokimia secara kualitatif (Tabel 6) menunjukkan ekstrak metanol bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh positif

mengandung senyawa triterpenoid, steroid, flavonoid, fenol, tanin, dan alkaloid pada kategori ada sampai sangat banyak kecuali pada kandungan senyawa saponin yang tidak terdeteksi pada bunga cengkeh dan pada tangkai bunga cengkeh terdapat pada kategori sedikit.

## PEMBAHASAN

Hasil uji *in vitro*, aktivitas antimalaria dari eugenol sintesis menunjukkan kategori aktivitas lemah. Kategori aktivitas antimalaria pada ekstrak metanol daun cengkeh juga tergolong aktivitas lemah, berbeda dengan nilai aktivitas antimalaria ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh yang termasuk kategori baik sampai menengah.

Hasil analisis kandungan eugenol pada ekstrak daun cengkeh lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan eugenol pada bunga dan tangkai bunga cengkeh. Ekstrak metanol daun cengkeh yang tinggi kandungan eugenolnya, mempunyai aktivitas antimalaria lemah sedangkan ekstrak metanol bunga

dan tangkai bunga cengkeh yang rendah kandungan eugenolnya mempunyai aktivitas antimalaria baik sampai menengah. Diduga, penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* tidak banyak dipengaruhi oleh eugenol (kelompok metabolit sekunder fenolik) tetapi oleh senyawa lain selain eugenol.

Alma *et al.* (2007) mengemukakan bahwa terdapat tiga jenis minyak esensial pada cengkeh yaitu minyak bunga cengkeh, minyak tangkai bunga cengkeh dan minyak daun cengkeh, masing-masing bagian memiliki komposisi kimia yang berbeda. Minyak bunga cengkeh mengandung eugenol (80-90%), eugenol asetat (15%), dan beta caryophyllene (5-12%). Milind & Deepa (2011) mengemukakan pada daun cengkeh kandungan eugenol meningkat berkisar antara 38,3-95,2% sedangkan kandungan eugenil asetat (51,2-1,5%) dan caryophyllene (6,3-0,2%) cenderung menurun. Pada bunga dan tangkai bunga cengkeh cenderung mengandung eugenol dalam persentase yang tidak terlalu besar tetapi kandungan caryophyllen cenderung meningkat.

Tabel 3 Persentase parasitemia ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh terhadap *P. berghei* (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>)

Perlakuan ekstrak metanol cengkeh	Dosis	Tingkat Parasitemia (%)±Standar Deviasi			
		H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>
Bunga	25	1,22±0,38 <sup>b</sup>	0,60±0,22 <sup>b</sup>	1,68±0,19 <sup>c</sup>	1,16±0,35 <sup>d</sup>
	50	2,20±0,57 <sup>a</sup>	0,75±0,28 <sup>b</sup>	1,53±0,53 <sup>c</sup>	0,64±0,94 <sup>cd</sup>
	100	2,44±0,89 <sup>a</sup>	0,13±0,25 <sup>b</sup>	4,17±1,07 <sup>b</sup>	1,97±1,69 <sup>a</sup>
Tangkai Bunga	25	2,26±0,53 <sup>a</sup>	0,97±0,73 <sup>b</sup>	2,74±0,85 <sup>bc</sup>	2,36±1,23 <sup>d</sup>
	50	2,86±0,50 <sup>a</sup>	0,85±0,41 <sup>b</sup>	4,49±0,78 <sup>b</sup>	1,09±1,63 <sup>c</sup>
	100	2,94±0,98 <sup>a</sup>	0,91±0,47 <sup>b</sup>	2,93±1,81 <sup>bc</sup>	4,94±3,86 <sup>a</sup>
Kontrol Negatif		2,81±0,52 <sup>a</sup>	3,31±0,83 <sup>a</sup>	9,51±2,93 <sup>a</sup>	13,96±3,91 <sup>b</sup>

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05

Tabel 4 Persentase Penghambatan Ekstrak Metanol Bunga dan Tangkai Bunga Cengkeh terhadap *P. berghei* (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>)

Perlakuan ekstrak metanol cengkeh	Dosis (mg/kg BB)	% Penghambatan			Rata-rata
		H <sub>1</sub> -H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> -H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>4</sub>	Penghambatan (%) H <sub>1</sub> -H <sub>4</sub>
Bunga	25	100	82,58	100	94,19
	50	100	87,42	100	95,81
	100	100	34,84	100	78,28
Tangkai Bunga	25	100	71,45	100	90,48
	50	100	41,29	100	80,43
	100	100	67,42	55	74,14
Kontrol Negatif		0	0	0	0,00

Tabel 5 Kandungan eugenol ekstrak dan minyak atsiri simplisia bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh

Kandungan (%)	Bunga	Tangkai bunga	Daun
Eugenol	36,43	88,93	91,18
Minyak Atsiri	2,55	3,55	2,55

Tabel 6 Hasil uji fitokimia Ekstrak Metanol Bunga, tangkai bunga dan cengkeh

Kandungan senyawa	Ekstrak Metanol cengkeh		
	Bunga	Tangkai Bunga	Daun
Triterpenoid	+++	+++	+++
Steroids	+	+++	+++
Flavonoids	++	++	+++
Phenol	++	+++	++
Tanins	+++	++++	+++
Saponins	-	+	+
Alkaloids	++	++	+++

Keterangan : ++++ = Sangat banyak; +++ = Banyak; ++ = Sedang; + = Ada; - = sedikit; - = Tidak terdeteksi

Fadipe et al. (2017) mengemukakan hasil uji *in vitro* antimalaria menggunakan senyawa turunan *Oleanolic Acid* (OA) atau nama lainnya *caryophyllen* dari bunga cengkeh 3-O-Acetyl-Oleanolic acid (OAA) menunjukkan  $IC_{50}$  4,3  $\mu$ g/mL dan OA mempunyai  $IC_{50}$  27,4  $\mu$ g/ml terhadap *P. falciparum*. Sibiyah et al. (2016) mengemukakan OA transdermal yang digunakan sebagai monoterapi atau dikombinasikan dengan klorokuin mampu membersihkan dan mengurangi parasit malaria dalam waktu yang lebih singkat tanpa menimbulkan efek buruk pada homeostasis glukosa pada tikus yang terinfeksi *P. berghei*. Diduga, tinggi rendahnya persentase kandungan *caryophyllen* turut mempengaruhi daya hambat cengkeh terhadap *P. falciparum* secara *in vitro* maupun terhadap *P. berghei* secara *in vivo*.

Efektivitas senyawa antimalaria berhubungan juga dengan kecepatan terserapnya senyawa tersebut bersama haemoglobin (Hb) sebagai protein target pada serangan malaria di eritrosit. *Plasmodium* dapat berkembang di dalam eritrosit karena mampu mendegradasi hemoglobin eritrosit di dalam vakuola makanan menjadi asupan protein sebagai bahan makanan parasit. Hemoglobin didegradasi dengan menggunakan protease yang spesifik. Degradasi hemoglobin menyebabkan terjadinya pelepasan heme yang selanjutnya menjadi hemozoin yang menyebabkan tersedianya oksigen sel menjadi berkurang atau mengalami stres oksidatif yang menimbulkan kerusakan sel (Wiser, 2017). Percário et al. (2012) menyatakan bahwa peran stres oksidatif pada patofisiologi malaria adalah fenomena multifaktorial dan merupakan aspek penting dari hubungan host-parasit yang rumit dan kompleks.

Penggunaan suplemen antioksidan dari produk

sintetis atau bahan alam menjadi strategi sangat efektif dalam aspek penyediaan senyawa antimalaria yang menyebabkan kerusakan pada parasit. Razzaghi-Asl et al. (2013), fitur struktural penting untuk aktivitas antioksidan adalah modifikasi cincin aromatik, yang meliputi perubahan jumlah dan posisi gugus hidroksi dan penyisipan elektron serta modifikasi dari fungsi karboksilat. Antioksidan berperan dalam penanganan penyakit terkait stres oksidatif.

Menurut Ahmed (2016) total senyawa fitokimia seperti fenol (eugenol) dan flavonoid bunga cengkeh menunjukkan aktivitas antioksidan yang efisien. Nam & Kim (2013) melaporkan eugenol mempunyai efek antioksidan yang efektif menangkal berbagai radikal bebas pada sel. Selain eugenol, *Caryophyllene* dalam bentuk beta-caryophyllene pada cengkeh juga memiliki efek antioksidan (Dahham et al., 2015).

Pada hasil uji *in vitro* terlihat bahwa eugenol sintetis mempunyai aktivitas lemah sebagai antimalaria. Menurut van Zyl et al. (2006) eugenol cengkeh mempunyai aktivitas antimalaria sangat lemah yaitu  $753,7 \pm 33,8 \mu$ M. Kil et al. (2005) mengemukakan bahwa eugenol dalam konsentrasi tinggi cenderung tidak berfungsi sebagai antioksidan tetapi berubah menjadi prooksidan yang bersifat toksik terhadap sel. Diduga persentase kandungan eugenol yang tinggi di dalam ekstrak daun cengkeh menyebabkan aktivitas antioksidan eugenol sebagai antimalaria terhambat (aktivitas lemah) dibandingkan bunga dan tangkai bunga cengkeh yang mempunyai kandungan persentase eugenol rendah (aktivitas antimalaria baik sampai menengah). Demikian juga pada uji aktivitas antimalaria secara *in vivo*, pada dosis perlakuan sedang dan tinggi (50 dan 100 mg/kg BB),

persentase penghambatan ekstrak cengkeh terhadap *P. berghei* cenderung menurun dibandingkan pada dosis rendah. Semakin tinggi dosis, persentase penghambatan juga mengalami penurunan. Efek ini dikenal dengan nama efek hormesis. Djuanda (2012) mengemukakan dalam ilmu toksikologi hormesis adalah fenomena reaksi dosis yaitu dosis kecil akan menimbulkan efek stimulasi, sedangkan dosis besar akan menyebabkan efek inhibisi, yang digambarkan sebagai kurva respon bentuk J atau bentuk U terbalik. Banyak senyawa antioksidan yang menghasilkan efek demikian, sehingga bila penggunaan antioksidan dengan dosis yang tepat akan menimbulkan efek positif/ stimulasi biologis, sedangkan antioksidans dalam dosis mega, justru menyebabkan efek merugikan bagi tubuh.

Kandungan senyawa cengkeh berbeda-beda pada setiap bagian yaitu bunga, tangkai bunga dan daun. Sampaio *et al.* (2015) menyatakan distribusi metabolit dalam perbungaan dan bagian akar terutama dipengaruhi oleh variasi beberapa nutrisi tanah seperti Ca, Mg, P, K dan Cu. Figueiredo *et al.* (2008) mengemukakan hasil dan komposisi metabolit sekunder pada tanaman yang mengandung senyawa volatil seperti pada minyak essential dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah variasi fisiologis, kondisi lingkungan, variasi geografis, faktor genetik dan evolusi.

Hasil uji toksisitas ( $LD_{50}$ ) ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh adalah 19743,327 dan 47304,436 mg/kg BB berada pada kategori tidak toksik. Liu *et al.* (2015) mengemukakan  $LD_{50}$  minyak cengkeh yaitu 4500 mg/kg BB. Cengkeh secara tradisional digunakan sebagai rempah-rempah seperti jahe untuk bumbu. Gottardi *et al.* (2016) menyatakan rempah-rempah telah digunakan sejak zaman purba sebagai bumbu penyedap dan pewarna makanan, relatif aman dan telah diuji secara *in vitro* dan *in vivo*. Cengkeh telah digunakan secara tradisional dalam keluhan dispepsia, perut kembung dan diare sebagai ramuan. Pemanfaatan bahan cengkeh sebagai obat terutama sebagai antimalaria dapat direkomendasi.

Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh varietas tuni Buru Selatan mempunyai aktivitas sebagai antimalaria pada uji *in vitro* maupun *in vivo*. Pada uji *in vivo*, rata-rata persentase penghambatan terhadap *Plasmodium berghei* lebih besar pada dosis uji 25 mg/kg BB baik ekstrak metanol bunga maupun tangkai bunga cengkeh. Ekstrak metanol bunga dan tangkai bunga cengkeh varietas tuni Buru Selatan tergolong tidak toksik dan berpotensi sebagai antimalaria.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada KEMDIKBUD Dirjen DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui beasiswa BPPDN tahun 2013 dengan SK penetapan nomor : 1251.34/E4.4/2013 tanggal 31 Juli 2013.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abd El Azim MHM, Amani M D El-Mesallamy , El-Gerby M , and Awad A. 2014. Anti-Tumor, Antioxidant and Antimicrobial and the Phenolic Constituents of Clove Flower Buds (*Syzygium aromaticum*). *Microbial & Biochemical Technology* S8 1-4.
- Ahmed W. 2016. Monitoring antioxidant and antityrosinase activity of clove aromatic flower buds. *Journal of Medicinal Plants Studies* 4: 163-169.
- Alma MH, Ertas M, Nits S, Kollmannsberger H. 2007. Chemical composition and Content of essential oil from the Bud of cultivated Turkish cloves (*Syzygium aromaticum* L.) *Bioresources* 2 : 265-269.
- Ashley EA, White NJ. 2014. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malaria Journal*. 13 : 1-11.
- Azas N, Laurencin N, Delmas F, Giorgio CD, Gasquet, Laget M, Timon-David P. 2002. Synergistic *in vitro* antimalarial activity of plant extracts used as traditional herbal remedies in Mali. *Parasitology Research* 88 : 165-171.
- Bagavan A, Rahuman AA, Kaushik NK, Sahal D. 2011. *In vitro* antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitology research*. 108 : 15-22.
- Bankole AE, Adekunle AA, Sowemimo AA, Umebese CE, Abiodun O, Gbotosho GO. 2016. Phytochemical screening and *in vivo* antimalarial activity of extracts from three medicinal plants used in malaria treatment in Nigeria. *Parasitology Research* 115:299–305.
- [BALITTRO] Badan Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. 2017. Cengkeh komposit zanzibar Karo. <http://balittro.litbang.pertanian.go.id/?p=1824>. Download : December 25, 2017.
- Bursatriannyo, 2017. Zanzibar Gorontalo. Pusat penelitian dan pengembangan perkebunan. <http://perkebunan.litbang.pertanian.go.id/?p=674>



- <http://perkebunan.litbang.pertanian.go.id/?p=6743>. Download : December 25, 2017.
- Bursatriannyo, 2015. Cengkeh varietas Afo. Pusat penelitian dan pengembangan perkebunan. <http://perkebunan.litbang.pertanian.go.id/?p=6089>. Download : December 25, 2017.
- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MBK, Ezzat MO, Majid ASA, Majid AMSA. 2015. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20 : 11808-11829.
- Dalai MK, Bhadra S, Chaudhary SK., Bandyopadhyay A, Mukherjee PK. 2014. Anti-cholinesterase activity of the standardized extract of *Syzygium aromaticum* L. *Pharmacognosy Magazine* 10 : 276-282.
- Djuanda E 2012. Hormesis, Rationalisasi Penggunaan Antioksidans Dan Platelet Rich Plasma. *Editorial MDVI* 39 : 149-150.
- Dua A, Garg G, Nagar S, Mahajan R. 2014. Methanol extract of clove (*Syzygium aromaticum* Linn.) damages cells and inhibits growth of enteropathogens. *Journal of Innovative Biology* 1 : 200-205
- Eloff JN. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60 : 1-8.
- European Medicine Agency. 2011. Assessment report on *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry, flos and *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry, floris aetheroleum. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC).
- Fadipe VO, Oguntunde A, Ibrahim HD and Opoku AR. 2017. Synthesis and in vitro antiplasmodial, in vitro antimycobacterial and in vitro cytotoxicity studies of oleanolic acid and its ester. *Natural Products Chemistry & Research* 5 Abstract.
- Fentahun S, Makonnen E, Awas T, Giday M. 2017. In vivo antimalarial activity of crude extracts and solvent fractions of leaves of *Strychnos mitis* in *Plasmodium berghei* infected mice. *Abstrak. BMC Complement Alternative Medicine* 17:13.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. 2008. Factors affecting volatile and essential oil production in plants. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 213-226.
- Gomez KA, Gomez AA. 1995. Prosedur statistik untuk penelitian pertanian. Terjemahan: Sjamsuddin E, Baharsjah SJ. Edisi ke dua. Penerbit Universitas Indonesia Press. p 7-86.
- Gottardi D, Bukvicki D, Prasad S, Tyagi AK. 2016. Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-20.
- Harborne J.B. 1987. Metode Fitokimia. Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Terjemahan: Padmawinata K, Soediro I. Edisi ke dua. Penerbit Institut Teknologi Bandung. p47-118.
- Inbaneson SJ, Ravikumar S, Suganthi P. 2012. In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant *Ocimum* species against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5: 103-106.
- [KEMENKES RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Info DATIN Malaria. <http://www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/InfoDatin-Malaria-2016.pdf>. Download: January 17, 2017.
- Kil UH, Lee KH, Lee KT, Jin JY. 2005. Eugenol induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Korean Journal Hematology* 40 : 65-74.
- Lin CH, Lin SH, Lin CC, Liu YC, Chen CJ, Chu CL, Huang HC, Lin MK. 2016. Inhibitory effect of clove methanolic extract and eugenol on dendritic cell functions. *Journal of Functional Foods* 27: 439-447.
- Liu BB, Luo L, Liu XL, Geng D, Li CF, Chen SM, Chen XM, Yi LT, Liu Q. 2015. Essential oil of *Syzygium aromaticum* reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-ERK/p-CREB/Brain-Derived neurotrophic factor expression. *Planta Medicines* 81: 185-192.
- Milind P, Deepa K. 2011. Clove: A champion spice. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 2 : 47-54.
- Mirpour M, Siahmazgi ZG, Kiasaraie MS, 2015. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius* PTCC 1448. *Journal of Oral Biology and Craniofacial research* 5 : 7-10.
- Murthihapsari, Parubak AS, Mangallo B, Ekasari W, Asih PB, Lestari AI. 2013. Isolation and presence of antimalarial activities Of marine sponge *Xestospongia* sp. *Indonesian Journal of Chemistry* 13 : 199 - 204.
- Muti'ah R, Hayati EK, Fatati A. 2016. Combination of *Calotropis gigantea* radix extract and artemisinin as an antimalarial agent against *Plasmodium berghei*. *Journal of Islamic Pharmacy* 01 : 12-19.
- Nam H, Kim MM. 2013. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 55: 106-112.

- Nondo RSO, Erasto P, Moshi MJ, Zacharia A, Masimba PJ, Kidukuli AW. 2016. In vivo antimalarial activity of extract of Tanzanian medicinal plants used for the treatment of malaria. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 7 :59-63.
- [PUSLITBANGBUN] Pusat penelitian dan Pengembangan Perkebunan, 2017. Tuni Bursel varietas unggul baru cengkeh. *Info tek Perkebunan* 9: 1-4.
- Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, Vilhena TC, Dolabela MF, Green MD, 2012. Oxidative Stress in Malaria. *International Journal of Molecular Sciences* 13 : 16346-16372.
- Rasoanaivo P, Deharo E, Ratsimamanga-Urverg S, Frappier F. 2004. Guidelines for the Nonclinical Evaluation of the Efficacy of Traditional Antimalarials. In: Willcox M, Bodeker G, Rasoanaivo P, editors. *Traditional Medicinal Plants and Malaria* US CRC: 259-263.
- Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O. 2013. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry*; 20 : 3711-3732.
- Sampaio BL, Edrada-Ebel R, Da Costa FB. 2015. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Science Reports* 6 : 1-11.
- Sibiya HP, Mabandla MV, Musabayane CT. 2016. The effects of transdermally delivered oleanolic acid on malaria parasites and blood glucose homeostasis in *P. berghei*-infected male Sprague-Dawley Rats. *Public Library of Science (PLOS) ONE* 11 : 1-18.
- Tanko Y, Mohammed A, Okasha MA, Umar AH, Magaji RA. 2008. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol extract of *Syzygium aromaticum* flower bud in wistar rats and mice. *The African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (AJTCAM)* 5 : 209 – 212.
- Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Sciences*. 193: 673-675.
- van Zyl RL, Seatholo ST, van Vuuren SF. 2006. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal Essential Oil Research* 18: 129-133.
- Vijayasteltar L, Nair GG, Maliakel B, Kuttana R, Krishnakumar IM. 2016. Safety assessment of a standardized polyphenolic extract of clove buds: Sub-chronic toxicity and mutagenicity studies. *Toxicology Reports* 3: 439-449.
- Wink M., 2015. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines* 2: 251-286.
- Wiser MF. 2017. *Biochemistry of Plasmodium* <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/fv.html>. Download: December 25, 2017.
- [WHO press] World Health Organization. 2017. World malaria report. Geneva (CH): WHO press. p32-34.
- [WHO press] World Health Organization. 2015. World malaria report. Geneva (CH): WHO press. p50-52.