

Karakterisasi Senyawa Penghambat Polimerisasi Heme Dari Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia* L.)

Purwaning Nugroho Widiyati^{1*}, Syamsudin¹, dan Partomuan Simanjuntak^{1,2}

¹Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Indonesia

²Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional (BBO OT), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Indonesia

Article info

History

Submission: 06-12-2022

Review: 31-05-2023

Accepted: 23-09-2023

*Email:

aningnw1@gmail.com

DOI: 10.33096/jffi.v10i2.937

Kata Kunci:

Momordica charantia L.; antimalaria; polimerisasi heme; fraksinasi; identifikasi

Keywords:

Momordica charantia L.; antimalarial; heme polymerization; fractionation; identification

Abstrak

Penyakit malaria yang disebabkan oleh infeksi parasit dari genus *Plasmodium* masih dilaporkan sebagai penyakit yang menyumbang angka kematian yang cukup tinggi di dunia. Namun, terdapat permasalahan lain yang dihadapi saat ini, yaitu kejadian resistensi penderita terhadap obat antimalaria yang ada di pasaran, sehingga menyebabkan kebutuhan mendesak untuk mengembangkan obat antimalaria baru yang aman dan murah. Penelitian ekstrak etanol buah pare (*Momordica charantia* L.) ini dilakukan dengan tujuan dapat memberikan informasi sebagai alternatif obat antimalaria berdasarkan mekanisme penghambatan polimerisasi heme sesuai metode Huy et. al serta mengidentifikasi senyawa isolat fraksi yang diprediksi mempunyai aktivitas antimalaria tersebut. Ekstrak etanol buah pare (*Momordica charantia* L.) dibuat dengan metode maserasi menggunakan etanol 96 % *pharmaceutical grade*, dipartisi menggunakan pelarut etil asetat dan aquades. Bagian partisi yang larut etil asetat difraksinasi dengan kromatografi kolom (SiO₂; i. n-heksan-etil asetat = 10 : 1 ~ 1 : 1; CH₂Cl₂-MeOH = 10 : 1 ~ 1 : 1 Hasil uji penghambatan polimerisasi heme diperoleh isolat fraksi 8.5 yang mempunyai aktivitas tertinggi yaitu IC₅₀ 302,78 ppm dan IC₅₀ (klorokuin difosfat sebagai kontrol positif IC₅₀ 218,71 ppm). Hasil identifikasi dengan spektroskopi LCMS/MS menunjukkan bahwa isolat fraksi 8-5 mengandung beberapa senyawa kimia seperti *momordicoside* L; *momordicoside* I dan *momordicoside* F2; dan *quercetin*. Senyawa kimia yang diprediksi berperan dalam menghambat polimerisasi Heme adalah senyawa *quercetin*.

Abstract

Malaria, which is caused by a parasitic infection of the genus Plasmodium, is still reported as a disease that contributes a high mortality rate in the world. However, there is another problem currently being faced, namely the incidence of patient resistance to antimalarial drugs on the market, causing an urgent need to develop new antimalarial drugs that are safe and inexpensive. Research on the ethanol extract of bitter melon (Momordica charantia L.) was carried out with the aim of providing information as an alternative antimalarial drug based on the mechanism of heme polymerization inhibition according to the method of Huy et. al and to identify the compound isolate fraction which is predicted to have the antimalarial activity. The ethanol extract of bitter melon (Momordica charantia L.) was prepared by maceration method using 96% pharmaceutical grade ethanol, partitioned using ethyl acetate and distilled water. Part of the partition which was soluble in ethyl acetate was fractionated using column chromatography (SiO₂; i. n-hexane-ethyl acetate = 10 : 1 ~ 1 : 1; CH₂Cl₂-MeOH = 10 : 1 ~ 1 : 1 The results of heme polymerization inhibition test obtained isolate fraction 8.5 which had the highest activity, namely IC₅₀ 302.78 ppm and IC₅₀ (chloroquine diphosphate as a positive control IC₅₀ 218.71 ppm). The results of identification by LCMS/MS spectroscopy showed that isolate fraction 8.5 contained



several chemical compounds such as momordicoside L; momordicoside I and momordicoside F2 and quercetin The chemical compound that is predicted to play a role in inhibiting Heme polymerization is quercetin.

I. Pendahuluan

Malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat dan merupakan salah satu penyakit parasit yang paling mematikan di seluruh dunia. Penyakit ini ditularkan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina dan diinfeksi oleh parasit dari genus *Plasmodium*. Pada tahun 2020, diperkirakan 241 juta kasus malaria terjadi secara global yang menyebabkan sekitar 583.000 kasus kematian (World Health Organization, 2021).

Di Indonesia, kasus malaria terbanyak disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* sebanyak 56,7 % dan *Plasmodium vivax* sebanyak 34,5 %. Pada tahun 2019 jumlah pasien malaria yang tercatat sebanyak 250.644 orang dan 49 kasus kematian (Kesehatan et al., 2020).

Resistensi *Plasmodium* terhadap semua obat antimalaria dan resistensi nyamuk terhadap insektisida telah menjadi masalah untuk pencegahan malaria, oleh karena itu menyebabkan kebutuhan mendesak untuk mengembangkan obat antimalaria baru yang aman dan terjangkau (Haldar et al., 2018; Pan et al., 2018).

Klorokuin sudah dikenal lama sebagai obat antimalaria. Penelitian Herraiz, *et.al*, 2019, membuktikan aktivitas antimalaria klorokuin melalui penghambatan pembentukan polimerisasi heme (β -hematin) oleh klorokuin dengan cara meningkatkan senyawa hemin bebas yang melibatkan reaksi peroksidatif dan menghambat pembentukan enzim *cysteine protease* (reaksi proteolisis) di dalam vakuola pencernaan *Plasmodium*. Enzim *cysteine protease* merupakan zat yang penting untuk pertumbuhan dan ketahanan *Plasmodium*. Sehingga melalui penelitian ini mengindikasikan bahwa penghambatan pembentukan polimerisasi heme (β -hematin) merupakan target yang ideal untuk skrining obat-obat antimalaria (Herraiz et al., 2019).

Momordica charantia L. (famili Cucurbitaceae), buahnya sangat populer di Indonesia. Berdasarkan studi etnofarmakologi sebelumnya, diperoleh informasi bahwa tanaman ini secara empiris banyak digunakan oleh masyarakat untuk pencegahan dan pengobatan malaria hingga sekarang (Abdillah et al., 2014; Slamet & Andarias, n.d.; Taek et al., 2018, 2019).

Beberapa penelitian telah mengeksplorasi tentang potensi aktivitas buah pare (*M. charantia* L.) sebagai antimalaria, di antaranya studi *in-vitro* ekstrak metanol *M. charantia* L. terhadap aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan parasit secara pengamatan mikroskopik kultur strain *P. falciparum* 3D7 diperoleh nilai $IC_{50} = 0,39 \mu\text{g/mL}$ (Susilawati

& Hermansyah, 2014). Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antimalaria melalui mekanisme kerja penghambatan pembentukan polimerisasi heme secara *in vitro* terhadap senyawa aktif yang diisolasi dari buah *M. charantia* L.

II. Metode Penelitian

II.1 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah seluruh bagian buah pare muda hijau (*M. charantia* L.) dari perkebunan di Sukabumi, Jawa Barat dan dideterminasi di Hebarium Bogoriense, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong, Jawa Barat.

Bahan kimia antara lain etanol 96% *pharmaceutical grade* (Brataco, Indonesia), silika gel GF60 (70-230 mesh) (Merck, Germany), etil asetat (Brataco, Indonesia), *n*-Heksana (Brataco, Indonesia), diklorometana (Brataco, Indonesia); metanol (Merck, Germany), cairan penyemprot KLT Serium sulfat (Merck, Germany), plat KLT GF 60/254 (Merck, Germany), cellite 545 (0,02 – 0,1 mm) (Merck-Germany), klorokuin difosfat (Sigma, USA), hemin klorida (Sigma, USA), tween 20 (Merck 822184), asam asetat (Merck, Germany), natrium asetat (Merck, Germany), DMSO (Merck, Germany), dan aquades.

II.2 Alat

Alat yang digunakan adalah Rotary vacuum evaporator (Stuart), timbangan analitik (Precise 2A0A), inkubator (Mettler), Elisa reader (Thermo), Kromatografi kolom, *Liquid Chromatography Mass Spectroscopy - Mass Spectroscopy* (LCMS/MS).

II.3 Ekstraksi, Pemisahan, Fraksinasi dan Identifikasi Fraksi Buah Pare (*M. Charantia* L.)

Seluruh bagian buah pare hijau segar (*M. Charantia* L.) dipotong kecil dan dimaserasi berulang sebanyak empat kali 24 jam dengan etanol 96 % *pharmaceutical grade* pada suhu kamar, kemudian ekstrak dievaporasi pada suhu $\leq 40^\circ\text{C}$ menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian, ekstrak *M. Charantia* L dipartisi dengan etil asetat dan aquades dengan perbandingan (1:1) di dalam corong pisah. Bagian partisi etil asetat difraksinasi lebih lanjut dalam kromatografi kolom (SiO_2 ; i. *n*-heksan – etilasetat = 10:1 ~ 1 : 1; ii. CH_2Cl_2 -MeOH = 10 : 1 ~ 1 : 1 menghasilkan 9 fraksi Aktivitas penghambatan polimerisasi heme paling besar (Fr. 8) difraksinasi kembali dengan kromatografi kolom (SiO_2 ; CH_2Cl_2 -MeOH = 10 : 1 ~ 2 : 1. Isolat fraksi 8.5 yang memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme paling besar diidentifikasi struktur kimianya dengan metode LCMS/MS.

II.4 Analisa Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia terhadap 0,5 gram ekstrak etanol buah pare (*M. Charantia* L.) dilakukan menggunakan metode standar untuk pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan steroid/triterpenoid (Harborne, 1998).

II.5 Pengujian Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Heme

Pengujian aktivitas antimalaria melalui penghambatan polimerisasi heme dilakukan berdasarkan metode Huy menggunakan hemin klorida dan tween 20 yang dimodifikasi. Klorokuin difosfat digunakan sebagai kontrol positif. Sampel diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 250 menit dan dilanjutkan dengan pengukuran serapan sampel dalam *microplate* 96 sumuran pada panjang gelombang 405 dan 620 nm menggunakan *Elisa reader* (12). Persentase penghambatan polimerisasi heme dihitung berdasarkan rumus (1).

$$f = \frac{(\text{serapan kontrol} - \text{serapan sampel})}{(\text{serapan kontrol} - \text{serapan min})}$$

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

Tabel 1. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol buah pare

No.	Uji	Pengamatan	Hasil
1	Alkaloid Pereaksi Dragendorff	Endapan merah kecoklatan	+
2	Flavonoid Pereaksi logam Mg + HCl + etanol + amil alkohol	Terbentuk warna jingga hingga merah	+
3	Saponin Pereaksi aquades dengan pengocokan	Terbentuk busa	+
4	Tanin Pereaksi aquades dan FeCl ₃ 10 %	Tidak terbentuk warna hitam kehijauan	-
5	Triterpenoid Pereaksi Liebermann Burchard	Terbentuk warna hijau	+

Keterangan: Tanda (+) menunjukkan hasil positif senyawa target; tanda (-) menunjukkan hasil negatif senyawa target

III.2. Hasil Pengujian Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Heme

Hasil pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi heme dari fraksinasi pertama dan kedua dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil aktivitas penghambatan polimerisasi heme oleh senyawa isolat fraksi

No.	Sampel	Konsentrasi (ppm)	Penghambatan (%)
1	Fraksi 1	500	8,46
2	Fraksi 2	500	10,92
3	Fraksi 3	500	2,38
4	Fraksi 4	500	33,09
5	Fraksi 5	500	21,51
6	Fraksi 6	500	15,11
7	Fraksi 7	500	25,70
8	Fraksi 8	500	54,76
9	Fraksi 9	500	48,85
10	Fraksi 8.1	500	42,97

Keterangan, f = Fraksi; Serapan_{kontrol}= Serapan hemin klorida sebagai kontrol negatif; Serapan_{sampel}= Serapan sampel ekstrak; Serapan_{min}= Serapan campuran hemin klorida dan tween 20.

II.6 Identifikasi Senyawa Aktif

Fraksi dari hasil fraksinasi kedua yang memiliki persentase penghambatan pembentukan polimerisasi heme tertinggi dilakukan identifikasi menggunakan spektroskopi LCMS/MS.

III. Hasil Dan Pembahasan

III.1 Hasil Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia sebagai identifikasi awal terhadap senyawa metabolit sekunder dalam buah pare (*M. charantia* L.) dengan metode kualitatif kandungan senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, dan triterpenoid (Tabel 1). Hasil uji skrining fitokimia terhadap sampel uji tergantung pada umur panen dari sampel, lokasi pengambilan sampel, larutan pengekstraksi, metode ekstraksi, dan lain-lain.

11	Fraksi 8.2	500	50,31
12	Fraksi 8.3	500	36,24
13	Fraksi 8.4	500	62,46
14	Fraksi 8.5	500	75,15

Hasil pemisahan lanjutan dari fraksi 8 menggunakan kromatografi kolom (silika gel 60), diklorometana - metanol 10:1 ~ 2:1) menghasilkan 5 isolat fraksi (fraksi 8.1 ~ 8.5) dan dari pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi heme didapatkan hasil isolat fraksi 8.5 yang memiliki penghambatan yang paling besar dari semua fraksi, yaitu sebesar 75,15 % (500 ppm).

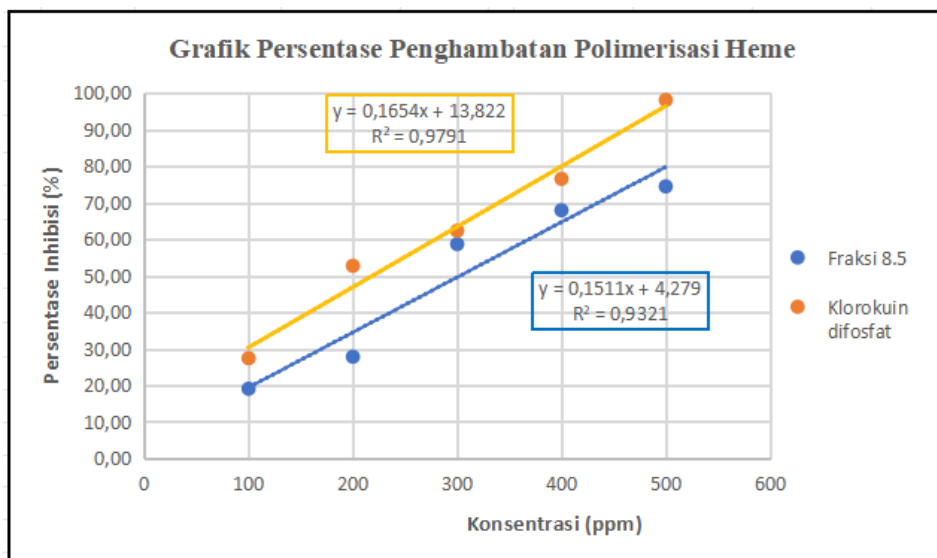
Hasil pengujian terhadap penghambatan polimerisasi heme oleh isolat fraksi senyawa menunjukkan bahwa isolat senyawa yang paling aktif dalam menghambat polimerisasi heme adalah Fraksi 8.5 dengan nilai IC₅₀ sebesar 302,78 ppm dan IC₅₀ Klorokuin difosfat sebesar 218,71 ppm (Tabel 3 dan Gambar 1). Dalam penelitian Baelmans dkk (2000), jika nilai IC₅₀ terhadap aktivitas penghambatan polimerisasi heme suatu senyawa lebih dari 6 mg/ml atau 3.095 ppm (Klorokuin difosfat 6,0 mM), dikategorikan sebagai senyawa

yang tidak memiliki aktivitas penghambatan pembentukan polimerisasi heme (Baelmans et al., 2000).

Berdasarkan nilai IC₅₀ isolat fraksi 8.5 yang diperoleh, dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dari Baelmans, dkk (2000) tersebut di atas, maka dapat disimpulkan bahwa isolat Fraksi 8.5 memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme, karena memiliki nilai IC₅₀ yang lebih kecil dari hasil tersebut. Dalam penelitian ini, nilai IC₅₀ isolat Fraksi 8.5 lebih besar dibandingkan dengan nilai IC₅₀ Klorokuin difosfat (kontrol positif), hal ini dapat disebabkan oleh karena isolat fraksi 8.5 bukanlah senyawa murni, melainkan gabungan senyawa-senyawa yang dapat menurunkan kemampuan aktivitas penghambatan polimerisasi heme dibandingkan dengan senyawa klorokuin difosfat sebagai kontrol positif yang merupakan senyawa murni (13).

Tabel 3. Hasil IC₅₀ aktivitas penghambatan polimerisasi heme oleh senyawa isolat fraksi 8.5 dan klorokuin difosfat

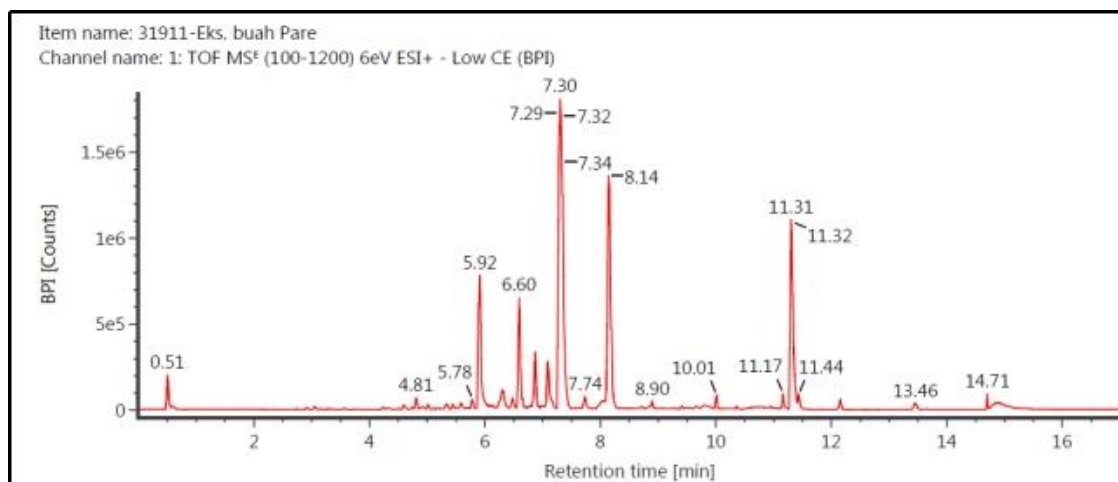
Sampel	Konsentrasi (ppm)	Penghambatan (%)	IC ₅₀ (ppm)
Fraksi 8.5	100	19,04	302,78
	200	27,81	
	300	58,69	
	400	67,96	
	500	74,50	
Klorokuin difosfat (Kontrol positif)	100	27,40	218,71
	200	52,73	
	300	62,33	
	400	76,57	
	500	98,18	



Gambar 1. Grafik persentase penghambatan polimerisasi heme

III.3. Identifikasi Isolat Fraksi 8.5

Pengujian dengan metode/ instrumen LCMS/MS menggunakan eluen air : metanol : asetonitril : isopropanol = 1 : 1 : 1 : 1. Dari proses identifikasi isolat fraksi 8.5 memperlihatkan hasil 6 (enam) kromatogram LCMS/MS.



Gambar 2. Kromatogram Waktu Retensi LCMS/MS dari Isolat Fraksi 8.5

Senyawa 1, spektrum MS pada Rt 5,92 menit memberikan *molecular ion peak* pada m/z 657 dengan bobot molekul 634. Berdasarkan penelusuran pustaka senyawa ini telah diisolasi dari buah pare (*M. charantia* L.) dan diidentifikasi memberikan *molecular ion peak* pada m/z 657 dengan bobot molekul 634 yaitu senyawa *momordicoside* L yang termasuk dalam golongan saponin dan dikaitkan dengan rasa pahit buah pare (*M. charantia* L.) (Liu et al., 2020).

Senyawa 2, spektrum MS pada Rt 6,60 menit memberikan *molecular ion peak* pada m/z 310 dengan bobot molekul 309. Namun, senyawa ini tidak diketahui, karena belum ditemukan data dari penelitian sebelumnya yang mencantumkan informasi tentang senyawa dari ekstrak buah pare (*M. charantia* L.) yang memiliki *molecular ion peak* pada m/z 310 dengan bobot molekul 309.

Senyawa 3, spektrum MS pada Rt 6,85 menit memberikan *molecular ion peak* pada m/z 641 dengan bobot molekul 618. Berdasarkan penelusuran pustaka senyawa ini telah diisolasi dari buah pare (*M. charantia* L.) yang diidentifikasi sebagai senyawa *momordicoside* I dan atau *momordicoside* F2 yang juga termasuk dalam golongan saponin dan dikaitkan dengan rasa pahit buah pare (*M. charantia* L.)

Senyawa 4, Spektrum MS untuk Rt 7,32 menit memberikan *molecular ion peak* pada m/z 303 dengan bobot molekul 302. Senyawa ini memiliki kemiripan dengan hasil isolasi dari buah pare (*M. charantia* L.) yang diidentifikasi sebagai senyawa flavonoid polifenol *quercetin*.

Senyawa *quercetin* ini diprediksi sebagai senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme. Penelitian Abu-Lavi et al (2020), menunjukkan data bahwa senyawa murni standar *quercetin* mampu menghambat

pembentukan polimerisasi heme (β -hematin) sebesar 83,4 %, sementara *amodiaquine* sebagai kontrol positif sebesar 91,7 %. (Abu-Lafi et al., 2020)

Mekanisme kerja dari quercetin diperkirakan mirip dengan mekanisme kerja kloroquin, di mana penghambatan pembentukan polimerisasi heme terjadi melalui pembentukan kompleks yang stabil terdiri dari obat-obat anti-malaria dan ferriheme. Pembentukan kompleks flavonoid quercetin dan ferriheme terjadi melalui interaksi zat FeIII pada ferriheme dengan salah satu gugus karbonil pada quercetin. Selanjutnya, pada sisi cincin gugus karboksil dari heme berinteraksi dengan salah satu gugus hidroksil pada quercetin. (Abu-Lafi et al., 2020)

Senyawa 5, spektrum MS untuk Rt 8,12 menit memberikan *molecular ion peak* pada dengan m/z 639 dengan 638. Penelusuran pustaka belum diketahui.

Senyawa 6, spektrum MS untuk Rt 8,16 menit memberikan *molecular ion peak* pada m/z 332 dengan bobot molekul 331. Penelusuran pustaka, belum diketahui.

IV. Kesimpulan

Isolat Fraksi 8.5 hasil fraksinasi buah pare (*M. charantia* L.) mempunyai aktivitas obat antimalaria melalui mekanisme kerja penghambatan pembentukan polimerisasi heme, dengan IC_{50} sebesar 302,78 ppm (IC_{50} kloroquin difosfat sebesar 218,71 ppm). Berdasarkan hasil identifikasi terhadap isolat Fraksi 8.5 dalam penelitian ini dengan metode LCMS/MS diprediksi bahwa senyawa *quercetin* memberikan aktivitas penghambatan pembentukan polimerisasi heme. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap aktivitas penghambatan polimerisasi heme dari

senyawa murni *momordicoside* L, *momordicoside* I dan *momordicoside* F2.

Daftar Pustaka

- Abdillah, S., Tambunan, R.M., Sinaga, Y.M. and 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, pp.S104-S107.
- Abu-Lafi, S., Akkawi, M., Al-Rimawi, F., Abu-Remeleh, Q. and Lutgen, P., 2020. Morin, quercetin, catechin and quercitrin as novel natural antimalarial candidates. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 8(3), pp. 184–190.
- Baelmans, R., Deharo, E., Muñoz, V., Sauvain, M. and Ginsburg, H., 2000. Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of β -hematin. *Experimental Parasitology*, 96(4), pp.243-248.
- Haldar, K., Bhattacharjee, S. and Safeukui, I., 2018. Drug resistance in Plasmodium. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), pp.156-170.
- Harborne, A.J., 1998. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.
- Herraiz, T., Guillén, H., González-Peña, D. and Arán, V.J., 2019. Antimalarial quinoline drugs inhibit β -hematin and increase free heme catalyzing peroxidative reactions and inhibition of cysteine proteases. *Scientific reports*, 9(1), p.15398.
- Huy, N.T., Maeda, A., Uyen, D.T., Trang, D.T., Sasai, M., Shiono, T., Oida, T., Harada, S. and Kamei, K., 2007. Alcohols induce beta-hematin formation via the dissociation of aggregated heme and reduction in interfacial tension of the solution. *Acta Tropica*, 101(2), pp.130-138.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia , 2020. Laporan Situasi Terkini Perkembangan Pengendalian Malaria di Indonesia Tahun 2019. pp. 1-19.
- Liu, Y.J., Lai, Y.J., Wang, R., Lo, Y.C. and Chiu, C.H., 2020. The Effect of Thermal Processing on the Saponin Profiles of *Momordica charantia* L. *Journal of Food Quality*, 2020, p.1-7.
- Pan, W.H., Xu, X.Y., Shi, N., Tsang, S.W. and Zhang, H.J., 2018. Antimalarial activity of plant metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), p.1382.
- Slamet, A. and Andarias, S.H., 2018. Studi Etnobotani dan Identifikasi Tumbuhan Berkhasiat Obat Masyarakat Sub Etnis Wolio Kota Baubau Sulawesi Tenggara. In *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning* (Vol. 15, No. 1, pp. 721-732).
- Susilawati, S. and Hermansyah, H., 2014. Uji Potensi Antiplasmodium Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* L.) Terhadap Plasmodium falcifarum. *Molekul*, 9(1), pp.13-17.
- Taek, M.M., Banilodu, L., Neonbasu, G., Watu, Y.V., EW, B.P. and Agil, M., 2019. Ethnomedicine of Tetun ethnic people in West Timor Indonesia: Philosophy and practice in the treatment of malaria. *Integrative Medicine Research*, 8(3), pp.139-144.
- Taek, M.M., Bambang, P.E. and Agil, M., 2018. Plants used in traditional medicine for treatment of malaria by Tetun ethnic people in West Timor Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(11), pp.630-637.
- World Health Organization, 2021. *World Malaria Report 2021*. www.who.int/teams/global-malaria-programme