ANTIMALARIALS
CASSIA (GEMS)
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

# SKRIPSI

**WIDIYANTO KURNIAWAN**

# UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA FRAKSI ALKALOID HASIL ISOLASI DARI DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei* *IN VIVO*

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**
**BAGIAN ILMU BAHAN ALAM**
**SURABAYA**
**2005**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

**Lembar Pengesahan**

# UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA FRAKSI ALKALOID HASIL ISOLASI DARI DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei* *IN VIVO*

## SKRIPSI

Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2005

**Oleh :**

**WIDIYANTO KURNIAWAN**
**050112365**

Disetujui Oleh :

| | |
|---|---|
| **Dra. Wiwied Ekasari, Apt.,Msi.** | **Drs. Herra Studiawan, Apt., MS.** |
| NIP. 132087863 | NIP. 131569383 |

# KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan karuniaNya sehingga penyusun dapat menyelesaikan tugas skripsi yang berjudul **UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA FRAKSI ALKALOID HASIL ISOLASI DARI DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei IN VIVO***

Skripsi ini dapat terselesaikan atas bantuan dan dorongan semua pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penyusun ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dra. Wiwied Ekasari, MSi, Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan petunjuk, bimbingan serta dorongan sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Drs. Herra Studiawan, MS, Apt selaku dosen pembimbing serta yang juga telah memberikan bimbingan dan masukan.
3. Dr. Bambang Prajogo EW, MS, Apt dan Dra. Rakhmawati, Msi, Apt selaku dosen penguji atas masukan yang diberikan untuk menyempurnakan skripsi ini.
4. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
5. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
6. Drs. Soebahagiono, Apt sebagai dosen wali yang telah membimbing dan selalu memberi saran selama 4 tahun ini.
7. Kepala bagian Ilmu Bahan Alam yang telah menyediakan bahan dan fasilitas penelitian
8. Seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membimbing dan membagi ilmunya.

9. Papa, Mama, Bapak, Ibu, Aan, Lia, Bagus, Bayu, paman-paman, bibi-bibi serta seluruh saudaraku tercinta yang selalu menyayangi dan mendoakan, memberi bantuan baik moril maupun materiil
10. Teman-teman tim malaria: Mbak Nurul, Mbak Vali, Ardhiez, Mas Agung Chow, Yusnita, Erna, Nuke dan Rafika yang selalu bersama dalam suka maupun duka.
11. Teman-teman angkatan 2001: Yovie, Ade, Arie, Putu, Hanung, Mas Tomi, Imam, Salim, Huda serta teman-teman yang lain" tanpa kalian farmasi tidak berarti"
12. Kepada Pak Jarwo, Mas Iwan, Mas Mahfud, Pak Pardi, Pak Kadi, Pak Lismo dan Pak Parto terima kasih banyak telah membantu kelancaran penelitian.
13. Seluruh karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu kelancaran studi penyusun.
14. Serta pihak-pihak bersangkutan yang belum sempat saya sebut namanya

Semoga Tuhan yang Maha Esa berkenan melimpahkan karunia-Nya sebagai balasan atas kebaikan dan bantuan yang telah diberikan. Dan dengan segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini penyusun mohon maaf dan berharap semoga skripsi ini berguna bagi kita semua. Amin

# RINGKASAN

Banyaknya korban malaria serta timbulnya resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria yang telah ada merupakan masalah yang masih belum bisa diatasi sampai saat ini. Salah satu cara untuk mengatasinya adalah dengan menemukan obat antimalaria baru dari bahan alam. Alkaloid dari daun *Cassia siamea* diduga memiliki aktivitas antimalaria. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui aktivitas penghambatan fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* pada pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit serta menentukan harga $ED_{50}$nya.

Serangkaian tahap ekstraksi dan fraksinasi dilakukan untuk mendapat kan fraksi alkaloid dari daun *Cassia siamea*. Mula–mula lemak sebagai pengotor ditarik dengan mengekstraksi serbuk daun dengan menggunakan pelarut n-heksan. Kemudian untuk menarik alkaloid dalam bentuk garam, dilakukan ekstraksi dengan etanol 90% yang mengandung asam tartrat 1%. Setelah pembasaan dengan $NH_4OH$ dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut kloroform untuk menarik alkaloid kembali dalam bentuk basanya. Fraksi kloroform selanjutnya difraksinasi dengan metode kromatografi kolom vakum dan kromatografi kolom terbuka. Fraksi alkaloid hasil isolasi kemudian diuji aktivitas antimalarianya.

Fraksi alkaloid hasil isolasi dibuat suspensi uji dengan dosis 5 mg/kg BB, 1 mg/kg BB, 0.5 mg/kg BB, 0.1 mg/kg BB, 0.05 mg/kg BB, dan 0.01 mg/kg BB Uji aktivitas antimalaria fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit pada penelitian kali ini menggunakan metode Peter. Berdasarkan metode Peter, mencit yang telah terinfeksi diberi perlakuan obat selama empat hari (D0-D3) dan dibuat hapusan darahnya sebelum perlakuan selama tujuh hari (D0-D6). Tiap harinya diamati prosentase eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei*, hasil pengamatan disebut persen parasitemia. Persen parasitemia dari hari ke hari mulai D0-D4 dihitung rata-ratanya sebagai persen pertumbuhan rata-rata. Perbandingan persen pertumbuhan fraksi alkaloid tiap dosis dibandingkan dengan persen pertumbuhan kontrol negatif, dari perbandingan tersebut kemudian dihitung persen penghambatan tiap dosis. Data dosis fraksi alkaloid beserta persen penghambatannya kemudian dianalisis secara probit sehingga didapat data $ED_{50}$.

Pada penelitian kali ini didapatkan hasil $ED_{50}$ fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* (dosis fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* yang menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebesar 50% secara *in vivo*) adalah sebesar 0,09818 mg/kg BB. Dibandingkan dengan klorokuin difosfat yang memiliki $ED_{50}$ sebesar 0,15611 mg/kg BB, maka bisa dikatakan fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* cukup potensial sebagai antimalaria. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antimalaria alkaloid dari daun *Cassia siamea*.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

# ABSTRACT

The aim of the research was to know antimalarial activity of alkaloids fraction which isolated from *Cassia siamea* leaves. This alkaloids fraction was regarded could inhibit the growth of malarial parasit. The *in vivo* method which used in this research was 4-day suppresive Peter's test. Variant dose of alkaloid fraction was given to mice infected Plasmodium berghei for four days. The dose that tested were 5 mg/kg body weight; 1 mg/kg body weight; 0.5 mg/kg body weight; 0.1 mg/kg body weight; 0.05 mg/kg body weight; 0.01 mg/kg body weight. This research yielded ED50 alkaloids fraction of *Cassia siamea* leaves as much as 0,09818 mg/kg body weight.

Key words: antimalarial activity, alkaloid fraction,*Cassia siamea* leaves, Peter's--test, ED50

# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR ..... v
RINGKASAN ..... vii
ABSTRACT ..... viii
DAFTAR ISI ..... ix
DAFTAR TABEL ..... xii
DAFTAR GAMBAR ..... xiii
DAFTAR LAMPIRAN ..... xiv
DAFTAR SINGKATAN ..... xv
BAB I PENDAHULUAN ..... 1
1.1 Latar Belakang ..... 1
1.2 Rumusan masalah ..... 4
1.3 Tujuan penelitian ..... 4
1.4 Hipotesis penelitian ..... 5
1.5 Manfaat penelitian ..... 5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA ..... 6
2.1 Tinjauan tentang tanaman *Cassia siamea* ..... 6
2.1.1 Identitas tanaman ..... 6
2.1.2 Nama Daerah ..... 6
2.1.3 Penyebaran *Cassia siamea* ..... 6
2.1.4 Morfologi *Cassia siamea* ..... 7
2.1.5 Kandungan *Cassia siamea* ..... 7
2.1.6 Manfaat *Cassia siamea* ..... 8
2.2 Tinjauan tentang Malaria ..... 8
2.3 Tinjauan siklus *Plasmodium* ..... 9
2.4 Klasifikasi dan Jenis Obat Antimalaria ..... 10
2.5 Tinjauan Tentang Penelitian *Cassia siamea* sebagai Antimalaria ..... 12
2.6 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman *in vivo* ..... 13
2.7 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei* ..... 14
2.7.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei* ..... 14
2.7.2 Morfologi *Plasmodium berghei* ..... 15

2.7.3 Pembiakan *in vivo Plasmodium berghei* ..... 17
2.8 Tinjauan tentang Alkaloid ..... 18
2.8.1 Alkaloid secara Umum ..... 18
2.8.2 Alkaloid sebagai Antimalaria ..... 19
2.9 Tinjauan tentang Kromatografi ..... 20
2.9.1 Kromatografi secara Umum ..... 20
2.9.2 Kromatografi lapis tipis ..... 21
2.9.3 Kromatografi Kolom ..... 21
2.9.4 Kromatografi kolom vakum ..... 21
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL ..... 23
3.1 Landasan Teoritik ..... 23
3.2 Skema Kerangka Konseptual ..... 24
BAB IV METODE PENELITIAN ..... 25
4.1 Bahan Penelitian ..... 25
4.2 Alat Penelitian ..... 25
4.3 Metode Ekstraksi dan Isolasi ..... 25
4.3.1 Metode Ekstraksi ..... 25
4.3.2 Metode Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Vakum ..... 26
4.3.3 Metode Identifikasi Alkaloid dengan Kromatografi Lapis Tipis ..... 28
4.3.4 Metode Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka ..... 28
4.4 Metode Uji Aktivitas Antimalaria secara *in vivo* ..... 31
4.4.1 Penyiapan *Plasmodium berghei* untuk penginfeksian mencit donor ..... 31
4.4.2 Penyiapan *Plasmodium berghei* untuk penginfeksian mencit coba ..... 31
4.4.3 Pembuatan preparat darah ..... 31
4.4.4 Penghitungan Parasitemia ..... 32
4.5 Uji Aktivitas Antimalaria ..... 32
4.5.1 Penyiapan Bahan Uji ..... 32
4.5.2 Pengujian Aktivitas Antimalaria secara In vivo ..... 33
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA ..... 35
5.1 Hasil Ekstraksi ..... 35

5.2 Hasil Kromatografi Kolom Vakum ..... 35
5.3 Hasil Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka ..... 35
5.4 Hasil Identifikasi Alkaloid ..... 37
5.5 Pembuatan Suspensi Uji ..... 38
5.6 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Alkaloid Hasil Isolasi ..... 40
5.7 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Klorokuin Difosfat ..... 43
BAB VI PEMBAHASAN ..... 46
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN ..... 51
DAFTAR PUSTAKA ..... 52

# DAFTAR TABEL

Tabel V.1 Fraksi alkaloid yang dihasilkan dari kromatografi kolom vakum ..... 36
Tabel V.2 Fraksi alkaloid yang dihasilkan dari kromatografi kolom terbuka ..... 36
Tabel V.3 Noda alkaloid yang terdapat pada fraksi alkaloid hasil Isolasi ..... 37
Tabel V.4 Persen parasitemia hasil perlakuan fraksi alkaloid dan kontrol negatif ..... 40
Tabel V.5 Persen parasitemia rata-rata hasil pemberian fraksi alkaloid dan kontrol negatif mulai D0 sampai D6 ..... 41
Tabel V.6 Persen pertumbuhan dan penghambatan fraksi alkaloid ..... 42
Tabel V.7 Persen parasitemia hasil perlakuan klorokuin difosfat dan kontrol negatif ..... 43
Tabel V.8 Persen parasitemia rata-rata hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif mulai D0 sampai D6 ..... 44
Tabel V.9 Persen pertumbuhan dan penghambatan klorokuin difosfat pada berbagai dosis ..... 45

# DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Cassia siamea* ..... 7
Gambar 2.2 Struktur Siamin ..... 8
Gambar 2.3 Struktur Siaminin A ..... 8
Gambar 2.4 Struktur Siaminin B ..... 8
Gambar 2.5 Morfologi *Plasmodium berghei* yang dilihat dengan mikroskop cahaya ..... 17
Gambar 2.6 Struktur Kinin ..... 19
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual ..... 24
Gambar 4.1 Skema ekstraksi dan isolasi alkaloid dari daun *Cassia siamea* 30
Gambar 5.1 Profil KLT fraksi A, B, dan C ditambah pereaksi Dragendorf 38
Gambar 5.2 Profil KLT fraksi A, B, dan C diamati dengan sinar UV 254 nm ..... 38
Gambar 5.3 Profil KLT fraksi A, B, dan C diamati dengan sinar UV 365 nm ..... 38
Gambar 5.4 Grafik persen parasitemia hasil pemberian fraksi alkaloid dan kontrol negatif mulai D0-D6 ..... 41
Gambar 5.5 Grafik persen parasitemia hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif mulai D0-D6 ..... 44

# DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat keterangan identifikasi ..... 56
Lampiran 2 Pembuatan larutan etanol 90% yang mengandung asam tartrat 1% ..... 57
Lampiran 3 Pembuatan Medium Alceiver ..... 58
Lampiran 4 Persen Parasitemia ..... 59
Lampiran 5 Persen Pertumbuhan ..... 60
Lampiran 6 Persen Penghambatan ..... 61
Lampiran 7 Hasil Uji Orientasi ..... 62
Lampiran 8 Hasil Analisis Probit Fraksi Alkaloid ..... 63
Lampiran 9 Hasil Analisis Probit Klorokuin Difosfat ..... 65

# DAFTAR SINGKATAN

| | | |
|---|---|---|
| WHO | = | World Health Organization |
| ANKA | = | Anverse Kasapa |
| CMC Na | = | Carboxy Methyle Cellulose Sodium |
| DMSO | = | Dimethylsulfoxide |
| MED | = | Minimum Effective Dose |
| $ED_{50}$ | = | Efektif dosis pada 50 % |
| MTD | = | Maximum Tolerated Dose |
| UNAIR | = | Universitas Airlangga |
| Pusvetma | = | Pusat Veterinaria Farma |
| TC | = | Tissue Culture |
| RBCs | = | Red Blood Cells |

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

# BAB I
# PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Malaria masih merupakan salah satu masalah kesehatan yang terbesar di seluruh penjuru dunia. Hal ini tidak mengherankan karena malaria dapat digolongkan sebagai salah satu penyakit yang paling banyak menyebabkan kematian di dunia. Berdasarkan data WHO (World Health Organization) pada tahun 2002, malaria menempati peringkat ke 4 tertinggi penyakit yang paling membunuh di dunia. Menurut CDC ( Clinical Disease Control and Prevention ) diperkirakan tiap tahunnya terjadi 300 juta kasus malaria dan telah membunuh setidaknya 1 juta jiwa tiap tahunnya

Di Indonesia, malaria tergolong penyakit menular yang masih bermasalah. Penyakit ini berjangkit di semua pulau di Indonesia, mulai dataran rendah sampai dataran tinggi, baik dikota maupun di desa. Berdasarkan survei kesehatan rumah tangga tahun 1995 diperkirakan 15 juta penduduk Indonesia menderita malaria dan 30.000 di antaranya meninggal dunia. Morbiditas malaria juga menunjukkan peningkatan yang signifikan. Di Jawa dan Bali, peningkatan terjadi dari 18 kasus per 100.000 penduduk pada tahun 1998 menjadi 48 kasus per 100.000 penduduk di tahun 2000. Di luar Jawa dan Bali, terdapat peningkatan dari 1.750 per kasus per 100.000 penduduk pada tahun 1998 menjadi 2.800 kasus per 1000.000 penduduk pada tahun 2000 (Mursito, 2002).

Upaya penanggulangan penyakit malaria dengan aktivitas yang diberi nama "gebrak malaria" telah dilakukan pemerintah dengan dukungan WHO. "Gebrak malaria" yang dimulai pada tahun 2000 meliputi kepulauan Riau, Cilacap, Jawa Tengah, dan Lombok Barat. Pada tahun 2001, kegiatan tersebut telah dikembangkan ke Nusa Tenggara Timur, Sulawesi Tengah, Kalimantan Selatan, Sumatera Selatan, dan Jawa Barat. (Mursito, 2002).

Namun ternyata malaria masih belum diatasi, sampai saat ini korban malaria di Indonesia terus bertambah dan persebarannya semakin merata serta dapat menyerang semua kalangan. Pada bulan Juli 2004 dua puluh satu prajurit TNI ikut terkena wabah malaria saat bertugas di Aceh Utara. Di propinsi Riau

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

pada tahun 2004, malaria telah memakan korban belasan jiwa. Di propinsi Lampung, karena wabah malaria, dua orang meninggal dunia dan puluhan lainnya harus menjalani perawatan medis. Yang lebih parah lagi di Sukabumi, Jawa Barat, pada bulan Juni 2004 saja sepuluh orang menjadi korban malaria.(Anonim, 2004).

Salah satu kendala pemberantasan malaria adalah timbulnya resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria yang telah ada. Selama bertahun-tahun klorokuin telah digunakan sebagai pengobatan malaria. Namun kini hampir di seluruh negara endemik malaria telah ditemukan resistensi *plasmodium* terhadap klorokuin. Lebih daripada itu resistensi dari *Plasmodium falciparum* telah berkembang untuk obat antimalaria yang lain. Pada beberapa tempat di Asia Tenggara, telah dilaporkan adanya resistensi terhadap klorokuin, sulfadoksin/piremetamin, meflokuin, halofantrin, dan kuinin. Pada beberapa tempat tersebut pengobatan yang efektif hanya kombinasi artemesinin dan turunannya( CDC, 2004 ). Karena masalah resistensi tersebut maka sebaiknya ditemukan obat antimalaria baru yang masih sensitif dan efektif terhadap parasit malaria.

Adapun dalam menemukan obat antimalaria baru sebaiknya berorientasi pada bahan alam daripada bahan obat sintetis. Hal itu dikarenakan saat ini di masyarakat, berkembang kecenderungan menggunakan pengobatan "back to nature". Ini didukung oleh semakin berkembangnya ilmu-ilmu fitoterapi seperti farmakognosi, fitokimia,dan fitofarmasi.(Tetty,2003). Ada beberapa keuntungan pengobatan dengan bahan alam atau fitoterapi. Keuntungan yang utama adalah ketersediaan bahan alam dalam jumlah yang cukup besar terutama di negara-negara berkembang. Di samping itu obat dari bahan alam dalam hal ini obat tradisional lebih dipercaya dan digunakan oleh sebagian besar penduduk dunia terutama di negara-negara berkembang. Efek samping dari obat bahan alam juga relatif lebih ringan dan dari segi ekonomis relatif lebih murah (Wijisekera,1991).

Untuk menemukan obat antimalaria baru dari bahan alam telah banyak dilakukan penelitian terhadap berbagai tumbuhan yang selama ini secara tradisional bisa digunakan untuk mengobati malaria. Salah satu tumbuhan yang telah diakui secara tradisional dapat mengobati malaria adalah *Cassia siamea*

(johar). Segenggam daun *Cassia siamea* yang diseduh dengan segelas air, kemudian diminum dua kali sehari selama tujuh hari dapat digunakan untuk mengobati malaria. (Soedibyo,1998)

Telah banyak dilakukan penelitian ilmiah untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari tumbuhan *Cassia siamea*. Gbeassor ( 1989 ) telah menguji aktivitas ekstrak air daun *Cassia siamea*. Purwanto ( 1997 ) dan Hadi ( 1997 ) mengekstraksi daun dan batang *Cassia siamea* dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan metanol. Kemudian setelah diuji didapatkan hasil bahwa ekstrak metanol daun memiliki aktivitas antimalaria terbesar. Namun para peneliti tersebut belum mengarahkan penelitiannya pada senyawa tertentu dari tanaman ini yang mempunyai aktivitas sebagai antimalaria.

Kandungan utama yang terdapat pada daun *Cassia siamea* adalah alkaloid, triterpenoid, dan antrakuinon (Depkes RI,1989) Alkaloid merupakan produk metabolit sekunder dari tumbuhan yang telah lama diketahui memiliki banyak manfaat pengobatan salah satunya adalah untuk antimalaria. Alkaloid kinin yang terdapat pada kulit batang *Cinchona succirubra* telah digunakan bertahun-tahun untuk mengobati malaria (Mursito,2002). Penemuan baru juga telah membuktikan bahwa alkaloid dari tanaman masih bermanfaat untuk mengobati malaria. 5'-O-demethyldioncophylline merupakan alkaloid jenis baru yang berhasil diisolasi oleh Bringmann *et al* (1998) dari akar *Triphyophyllum peltatum* dan dilaporkan bermanfaat sebagai antimalaria. Hallock *et al* (1998) berhasil mengisolasi alkaloid isokuinolin yaitu Korundamin A dari tumbuhan *Ancistrocladus korupensis* dan terbukti berhasil menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. Karena hal-hal tersebut di atas maka ada kemungkinan alkaloid yang terdapat pada daun *Cassia siamea* juga efektif sebagai antimalaria.

Untuk dapat menguji aktivitas alkaloid dari daun *Cassia siamea* maka diperlukan cara yang efektif untuk mengekstraksi sekaligus mengisolasinya. Harapan untuk menguji aktivitas alkaloid dari *Cassia siamea* semakin terbuka setelah El-Sayyed ( 1984 ) berhasil menemukan cara yang optimal untuk mengekstraksi alkaloid isokuinolin dari daun *Cassia siamea*. Dengan metode yang hampir sama, Ekasari ( 2001 ) berhasil mengekstraksi dan mengisolasi kemudian menguji aktivitas isolat alkaloid daun *Cassia siamea* secara *in vitro*. Sehingga

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga



kemudian terbukti bahwa isolat alkaloid daun *Cassia siamea* cukup efektif mengobati malaria yaitu dengan memberikan harga $IC_{50}$ ( Inhibitory Concentration 50) sebesar 0,24 μg/ml. Namun uji aktivitas antimalaria golongan alkaloid dari daun johar secara *in vivo* selama ini masih belum dilakukan. Padahal uji secara *in vivo* lebih bermanfaat karena lebih menggambarkan aktivitas obat terhadap kondisi parasit secara langsung di tubuh inang. Untuk itulah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu untuk mengetahui sejauh mana aktivitas antimalaria fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* jika diberikan secara *in vivo*.

Pengujian aktivitas antimalaria secara *in vivo* menggunakan *Plasmodium berghei* yang diinfeksikan pada tubuh mencit. *Plasmodium berghei* merupakan model penelitian untuk uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* karena *Plasmodium berghei* memiliki kemiripan morfologi dan rangkaian genom yang sama dengan *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi manusia (Phillipson, 1991).

## 1.2 Rumusan masalah

Apakah fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit?

## 1.3 Tujuan penelitian

Umum : Mengetahui aktivitas penghambatan fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* pada pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit.

Khusus : Menentukan harga ED 50 fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga


## 1.4 Hipotesis penelitian

Fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit.

## 1.5 Manfaat penelitian

Dapat diketahui sejauh mana efektifitas fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* sehingga dapat digunakan dijadikan landasan ilmiah penggunaan daun *Cassia siamea* untuk dikembangkan dan diteruskan menjadi obat antimalaria baru.

# BAB II
# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Tinjauan tentang tanaman *Cassia siamea*

### 2.1.1 Identitas tanaman ( Becker C.A and Backhuizen 1963 )

| | |
|---|---|
| Divisi | : Spermatophyta |
| Anak divisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Anak kelas | : Dialypetalae |
| Bangsa | : Leguminosae |
| Suku | : Caesalpiniaceae |
| Marga | : *Cassia* |
| Jenis | : *Cassia siamea* Lamk |

### 2.1.2 Nama Daerah (Heyne, 1987) (Agroforestry Database, 2004)

Johar, juwar (Indonesia);Mezali (Birma);Golden rain, Iron wood, Kassod tree, Yellow cassia (Inggris); Angkant, Minjiri, Moung (Filipina); Casse de Siam, Cassia (Prancis); Amaltas, Bandarlathi (India); Bereksa, Rajah kayu, Tengguli (Malasyia); Acacia amarilla, Casia de Siam, Flamboyán amarillo (Spanyol); Mjohoro (Swahili); Konnai, Sarak-konne, Tiru kontai (Tamil); Khi lek, Pak chili (Thai); Muòng xiêm (Vietnam)

### 2.1.3 Penyebaran *Cassia siamea*

*Cassia siamea* merupakan tanaman asli India dan Sumatra atau sekitar katulistiwa. Tanaman ini merupakan salah satu jenis pohon yang banyak di budidayakan di pulau Jawa. Tanaman ini banyak terdapat disepanjang jalan sebagai pohon peneduh. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian kurang lebih 1000 m diatas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang tidak terlalu baik (Heyne, 1987)

### 2.1.4 Morfologi *Cassia siamea*

Pohon, tinggi 2-20 m. Daun menyirip genap. Kelenjar poros daun tidak ada atau satu di antara pasangan daun terbawah. Anak daun oval sampai memanjang, kerapkali melekuk ke dalam, bagian atas gundul dan mengkilat sedikit, bawah berambut halus, 3-7,5 kali 1-2,5 cm. Daun penumpu cepat rontok, sangat kecil dan tidak berarti. Kelopak berbagi 5 dalam. Daun mahkota kuning cerah, panjang 2 cm. Tangkai sari terpanjang 1 cm. Bakal buah dengan tangkai putik sama panjang dengan tangkai sari terpanjang. Polongan dengan katup yang tebal dan sambungan yang sangat dipertebal, di antara sambungan berbelok-belok, 15-30 kali 1,5 cm, berkatup 2. Biji 20-30, panjang 1,5 kali lebar (Steenis, C. G. G. J, Dr, 1997).

Gambar 2.1 *Cassia siamea* (Yamazaki, 2000)

### 2.1.5 Kandungan *Cassia siamea*

Kandungan yang terdapat pada tumbuhan *Cassia siamea* antara lain:

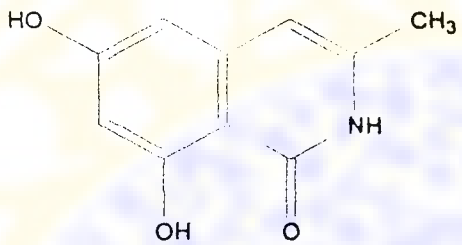
Pada daun : sitosterol, flavonoid barakol, apigenin, kaempferol (Rao *et al.*,1978) siamin, cassiamin, krisopanol (Wagner *et al.*,1977) anhidrobarakol (Ingkaninan *et al.*,2000) alkaloid isokuinolin –siaminin A, siaminin B, siaminin C- (El-Sayyad,1984).

Pada batang : tannin, antrakinon, liginin, pentosa hidrosianat (Depkes RI,1989)

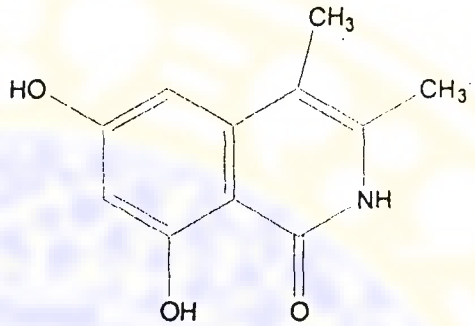
Pada akar : bioantrakuinon (Koyama *et al*,2001), pinitol (Budhasukh, 2000).

Pada buah : antrakuinon, krisopanol (Abdallah *et al*, 1987)

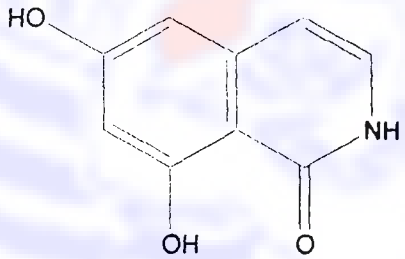
Pada bunga : flavon, pinitol, sitosterol, stigmasterol, kolesterol, sorbiterol (Varshney 1977), cassiadinin, alkaloid kromon, triterpenoid (Biswas dan Malik, 1986)




Gambar 2.2 Struktur Siamin




Gambar 2.3 Struktur Siaminin A




Gambar 2.4 Struktur Siaminin B

**2.1.6 Manfaat *Cassia siamea*** (Heyne, 1987)

1. Daun *Cassia siamea* digunakan secara tradisional oleh masyarakat Jawa sebagai antimalaria.
2. Akarnya dapat digunakan sebagai obat cacing.
3. Bunga dan buahnya dapat digunakan sebagai tonikum.
4. Batang untuk kayu bangunan atau kayu bakar.

## 2.2 Tinjauan tentang Malaria

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan parasit *Plasmodium* yang ditularkan ke manusia lewat gigitan nyamuk *Anopheles* betina. (Health Encyclopedia,2004). Ada empat spesies penyakit malaria (*Plasmodium*) yang menyerang manusia yaitu:

1.*Plasmodium falciparum*

2.*Plasmodium malariae*

3.*Plasmodium vivax.*

4.*Plasmodium ovale*

Tiga tanda karakteristik utama dari infeksi malaria adalah demam,anemia,dan pembengkakan limpa (splenomegali). Demam merupakan gejala paling awal yang diperlihatkan oleh penderita malaria, waktunya berkisar antara beberapa hari sampai beberapa minggu. *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, dan *Plasmodium ovale* menyebabkan demam setiap 48 jam sekali. Sementara *Plasmodium malariae* menyebabkan demam 72 jam sekali. Gejala demam dari malaria sangat spesifik. Sebelum timbul demam, gejala awal yang tampak berupa mual sampai muntah, lesu dan rasa nyeri pada kepala, serta terjadi penurunan selera makan. Demam yang terjadi pada malaria berlangsung 3 tahap.

Tahap pertama, penderita mengalami demam menggigil merasa dingin dan bila diraba dipergelangan tangan denyut nadi terasa cepat, tetapi lemah. Bibir dan jari tangan tampak kebiru-biruan dengan kulit terasa kering kadang-kadang terjadi muntah-muntah dan bahkan kejang-kejang. Pada anak-anak proses kejang ini lebih sering dialami. Demam tahap ini berlangsung 15 menit-1 jam. Tahap kedua, demam berlangsung 2-6 jam. Gejalanya wajah tampak memerah, kulit kering dan panas terasa terbakar, nyeri kepala, dan muntah-muntah. Denyut nadinya terasa keras dan selalu merasa haus. Suhu badan dapat mencapai 41°C. Tahap ketiga, demam berkeringat selama 24 jam. Penderita dapat mengalami pembengkakan limpa, terutama pada penderita malaria yang sudah lama. Limpa tersebut menjadi keras dan mudah pecah.

## 2.3 Tinjauan siklus *Plasmodium*

Siklus hidup *Plasmodium* terdiri dari 2 fase yaitu siklus aseksual dan siklus seksual. Sebagai tempat pembelahan aseksual adalah manusia, sedangkan tempat terjadinya siklus aseksual atau reproduksi yang disertai dengan sporogoni adalah nyamuk *Anopheles* betina

1. Siklus aseksual terdiri dari :

a. *Siklus hati* :

Penularan terjadi bila nyamuk betina, yang terinfeksi parasit, menyengat manusia dan dengan ludahnya menyuntikkan "sporozoit" kedalam peredaran darah yang untuk selanjutnya bermukim disel-sel parenkim dari hati (bentuk preeritrositer).

Nyamuk jantan tidak menyengat karena hanya hidup dari tumbuh-tumbuhan.Parasit tumbuh dan mengalami pembelahan kuat (proses schizogoni, dengan menghasilkan schizont).6-9 hari kemudian,schizont menjadi masak dan melepaskan diri berupa beribu-ribu merozoit.Fase ini (didalam hati) disebut bentuk EE promer (ekso-eritrositer = diluar eritrosit).

b. *Siklus darah* (*siklus eritrosit*).

Dari hati sebagian merozoit memasuki sel-sel darah merah dan berkembang disini menjadi trofozoit. Sebagian lainnya memasuki jaringan lain, antara lain limpa atau berdiam dihati dan disebut bentuk-EE sekunder. Didalam eritrosit terjadi pembelahan aseksual pula (schizogoni). Dalam waktu 48-72 jam, sel-sel darah merah pecah dan merozoit yang dilepaskan dapat memasuki eritrosit lain dan kemudian siklus dimulai kembali. Setiap saat sel-sel darah merah pecah, penderita merasa kedinginan dan demam; hal ini disebabkan oleh merozoit dan protein asing yang dipisahkannya.

2. Siklus seksual.

Setelah beberapa siklus, sebagian merozoit didalam eritrosit dapat berkembang menjadi bentuk-bentuk seksual betina dan jantan. Gametosit ini tidak berkembang lagi dan akan mati bila tidak dihisap oleh Anopheles betina. Di dalam lambung nyamuk, terjadi penggabungan (pembuahan) dari gametosit jantan dan betina menjadi zygote, yang kemudian mempenetrasi dinding lambung dan berkembang menjadi ookista. Dalam waktu tiga minggu, terjelmalah banyak sporozoit kecil yang memasuki kelenjar ludah nyamuk. Akhirnya, bila nyamuk (betina) ini menyengat manusia.

**2.4 Klasifikasi dan Jenis Obat Antimalaria**

Berdasarkan siklus hidup dimana obat bekerja atau berdasarkan cara kerjanya, antimalaria dikelompokkan sebagai berikut (Siswandono dan Soekardjo, 2000):

1. Sizontosida jaringan

   Obat kelompok ini menghancurkan bentuk jaringan primer *Plasmodium* dan merozoit dihati, dimulai dari tahap infeksi eritrositik, kemudian mencegah invasi eritrositik dan penyebab infeksi ke nyamuk *Anopheles.*

2. Sizontosida darah

   Obat kelompok ini bekerja terhadap merozoit pada fase eritrositik aseksual dari parasit malaria dan mengganggu schizogeni eritrositik.

3. Gametositosida

   Pada kelompok ini menghancurkan bentuk eritrositik seksual (gametosit) dari parasit malaria sehingga mencegah penyebaran plasmodium ke nyamuk *Anopheles.*

4. Sporozoitosida

   Obat kelompok ini mampu membunuh sporozoit segera setelah masuk dalam darah sesudah gigitan nyamuk.

5. Sporontosida

   Obat kelompok ini bekerja pada tubuh nyamuk malaria yang menginfeksi hospes dengan cara mencegah pembentukan oosit dan sporozoit (Siswandono dan Bambang Soekardjo, 2000).

Macam-macam obat antimalaria yang umum dipakai dan tergolong lama menurut golongan kimianya adalah :

1.Derivat kuinolin
- alkaloid kinkona : kinina, kuinidin ,dan kinkonin
- 4 amino-kuinolin : klorokuin dan amodiakuin
- 8 amino-kuinolin : primakuin

2.Derivat para amino benzoid acid ( PABA) competitors
- derivat sulfonamid : sulfadoksin,sulfadiazin,sulfalen
- derivat sulfon : dapson

3.Derivat *Dihydrofolate Reductase* ( DHFR) *inhibitors*
- diaminopirimidin : pirimetamin
- biguanid : proguanil

4.Antibiotik
- Tetrasiklin,doksisiklin dan klindamisin

Di samping obat-obat antimalaria di atas sekarang sudah tersedia beberapa obat yang lebih baru,yang dibagi menurut golongan kimianya adalah:

1.Golongan 4-kuinolon-metanol : meflokuin

2.Golongan 9-fenantren-metanol : halofantrin

3.Golongan hidroksi-naftokuinon : atovakon

4.golongan seskuiterpen lakton : artemisinin

Dari obat-obat tersebut yang bersifat sebagai sizontosida jaringan adalah primakuin. Klorokuin, amodiakuin, kina, dan meflokuin mempunyai efek sizontosida darah. Primakuin dapat menghambat pertumbuhan gametosit pada *Plasmodium falciparum*. Sedang klorokuin menghambat pertumbuhan ganetosit *Plasmodium vivax/ ovale/ malariae*. Proguanil menghambat pertumbuhan gamet dalam nyamuk (sporontosida).

Halofantrin merupakan sizontosida yang aktif terhadap semua spesies *Plasmodium*, juga aktif terhadap *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap klorokuin dan kombinasi sulfadoksin-pirimetamin. Atovakon sering dikombinasikan dengan proguanil. Artemisinin dan derivatnya merupakan sizontosida darah yang cepat dan kuat terhadap semua spesies *Plasmodium*, serta juga mempunyai efek gametosidal (Mursito,2002).

**2.5 Tinjauan Tentang Penelitian *Cassia siamea* sebagai Antimalaria.**

Gbeassor ( 1989 ) telah menguji aktivitas ekstrak air daun *Cassia siamea* dan dinyatakan bahwa tanaman ini dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. Purwanto ( 1997 ) mengekstraksi daun *Cassia siamea* dengan pelarut n-heksana, kloroform, dan metanol. Kemudian setelah diuji in vitro didapatkan hasil bahwa ekstrak metanol daun memiliki aktivitas antimalaria terbesar yaitu dengan memberikan harga $IC_{50}$ sebesar 1,84 μg/ml. Hadi (1997) melanjutkan penelitian dengan mengekstraksi kulit batang *Cassia siamea* dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan metanol, seperti halnya pada penelitian terdahulu ekstrak methanol juga memberikan aktivitas terbesar yaitu memberikan harga $IC_{50}$ sebesar 36,14 μg/ml, namun jika dibandingkan ekstrak dari daun, ekstrak dari kulit batang masih kurang efektif. Wahjoedi (1997) telah menguji aktivitas antimalaria infus, ekstrak etanol 70%, ekstrak kloroform, dan ekstrak eter dari

daun *Cassia siamea*. Diperoleh hasil ekstrak 70% daun *Cassia siamea* mempunyai aktivitas terbaik dan toksisitas terkecil dibanding ketiga ekstrak yang lain.

El-Sayyed ( 1984 ) berhasil menemukan cara yang optimal untuk mengekstraksi alkaloid isokuinolin dari daun *Cassia siamea*. Dengan metode yang hampir sama, Ekasari ( 2001 ) berhasil mengekstraksi dan mengisolasi kemudian menguji aktivitas ekstrak etanol, ekstrak kloroform, fraksi 16,dan isolat alkaloid daun *Cassia siamea* secara in vitro. Masing-masing memberikan harga $IC_{50}$ sebesar 7,06 μg/ml; 2,41 μg/ml; 1,70 μg/ml; dan 0,24 μg/ml.

**2.6 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman *in vivo***

Ada dua tipe yang berbeda untuk pengujian dengan *P.berghei* yaitu:

1. Tes Peter ( *The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*).

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat 20 ±2 g ditempatkan dalam ruang bersuhu 22°C (±2°C) sebanyak 5 kelompok dan diberi makanan dengan menu standar. Darah dari mencit donor dengan parasitemia yang sudah tinggi (sekitar 20 % erirosit yang terinfeksi) dilarutkan dalam medium kultur (TC199) sampai tiap 0.2 ml mengandung $10^7$ erirosit yang terinfeksi. Tiap mencit diberi 0.2 ml secara intravena diekor pada hari 0. Ekstrak tanaman bisa dilarutkan atau dibuat suspensi dengan triturasi atau sonifikasi setelah penambahan 0.2 % larutan tween atau 0.5 % larutan CMC atau DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan perhari dengan rentang dosis 1 -- 100 mg/kg berat badan dimulai semenjak hari mulainya penginfeksian selama 4 hari berturut –turut lewat rute subkutan atau oral. Pada hari kelima, diambil sampel darah dari ekor dan dilakukan pewarnaan dengan pewarna yang sesuai (misal *Giemsa*) dan diukur persentase jumlah eritrosit yang mengandung parasit dibandingkan jumlah total eritrosit. Harga ED50 (dalam hal ini berarti adanya penekanan parasit sebanyak 50% bila dibandingkan dengan kontrol) bisa dihitung dengan log dosis/aktivitas probit. Standar deviasi dihitung menggunakan program komputer yang sesuai. Untuk skrining dalam skala besar, Sebuah dosis besar (misal 100 mg/kg berat badan) bisa diberikan sebagai pengganti dosis yang lebih kecil tapi diberikan beberapa kali.

2. Tes Rane

Dasar dari tes ini adalah membandingkan efek dari perlakuan standar pemberian *P.berghei* yang membunuh mencit dalam 6 hari dengan perpanjangan waktu bertahan hidup sampai 12 hari, dengan perlakuan pemberian sebuah dosis tunggal senyawa yang diuji cobakan. Kelompok standar diberikan $10^6$ sel donor yang terinfeksi secara intraperitonial pada hari 1 dan larutan ekstrak tanaman atau suspensi dalam oleum arachidis yang telah tersonifikasi diberikan secara subkutan dengan dosis 640, 320, 160, dan 80 mg/kg berat badan pada hari keempat.

Penilaian aktivitas berdasarkan jumlah yang masih hidup, lebih dari dua kali lipat dibandingkan kelompok kontrol. *Minimum Effective Dose* (*MED*) yang didapat dibandingkan dengan *Maximum Tolerated Dose* yang mengakibatkan tidak lebih dari 1/5 jumlah mencit mati karena efek toksik. Dosis yang lebih rendah mungkin dibutuhkan untuk mendapatkan harga *MED*. Walaupun tes ini terbilang masih kasar bila dibandingkan dengan tes Peter, tetapi tes ini terbukti lebih dalam mengetahui mengetahui profil obat baru karena menyertakan ukuaran perbandingan antara efikasi melawan toksisitasnya.

Kedua tes ini tidak bisa digunakan untuk identifikasi senyawa yang bersifat long acting dan bila informasi mengenai hal ini dibutuhkan maka bisa digunakan tes dengan *P.yoelli* atau *P.vincey* pada mencit. Tes malaria pada rodensia juga bisa digunakan untuk pengujian senyawa yang memiliki aktivitas skizontosida dan gametosida jaringan.(Phillipson,1991).

## 2.7 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei*

### 2.7.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

Klasifikasi Plasmodium berghei adalah sebagai berikut :

| | |
|---|---|
| Filum | : Protozoa |
| Subfilum | : Sporozoa |
| Kelas | : Telosporea |
| Subkelas | : Coccidea |
| Suku | : Plasmodiidaea |
| Marga | : *Plasmodium* |
| Jenis | : *Plasmodium berghei* |

### 2.7.2 Morfologi *Plasmodium berghei*

*Plasmodium berghei* merupakan parasit penyebab malaria pada rodensia. Dalam darah rodensia ada beberapa bentuk parasit dan fase perkembangannya yang dapat di temukan, diantaranya adalah :

- Bentuk cincin

  Tampak seperti cincin dengan sitoplasma berwarna biru dengan nukleus kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan *Giemsa* dari pulasan darah tepi.

- Bentuk trofozoit

  Bentuknya *amuboid*, nukleus berwarna merah sedangkan sitoplasma berwarna biru, dan dengan pembelahan nukleus, stadium sizon terjadi.

- Bentuk sizon

  Bentuk/stadium/fase/tingkat Plasmodium yang mengalami proses pembelahan secara aseksual. Ukuran kira-kira 27 μm pada hari keempat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas, kemungkinan diakibatkan sitoplasma yang rusak karena parasit dan tersebar pada dua pertiga bagian eritrosit; disebut sizon muda (immature schizont) jika pembelahan masih berlangsung awal, dan sizon matang (mature schizont) jika pembelahan itu berlangsung sempurna; kemudian sel darah merah yang diinfeksinya pecah.

- Bentuk sizogoni

  Proses terjadinya sizon dengan pembelahan aseksual dengan hasil akhirnya adalah merozoit-merozoit yang terbentuk didalamnya.

- Bentuk sporogoni

  Proses reproduksi secara seksual yang berlangsung dalam tubuh nyamuk dengan hasil akhirnya sporozoid.

- Bentuk gametosit

  Macam gametosit ada dua yaitu mikrogametosit dan makrogametosit. Makrogametosit berbentuk oval, bernoda biru mengandung kumpalan nukleus dan granul, sedangkan mikrogametosit berbentuk seperti ginjal

atau kacang, bernoda biru lemah atau kemerahan mengandung nukleus yang mengkilat dan granul yang lebih kecil dan tersebar.

- Bentuk gamet

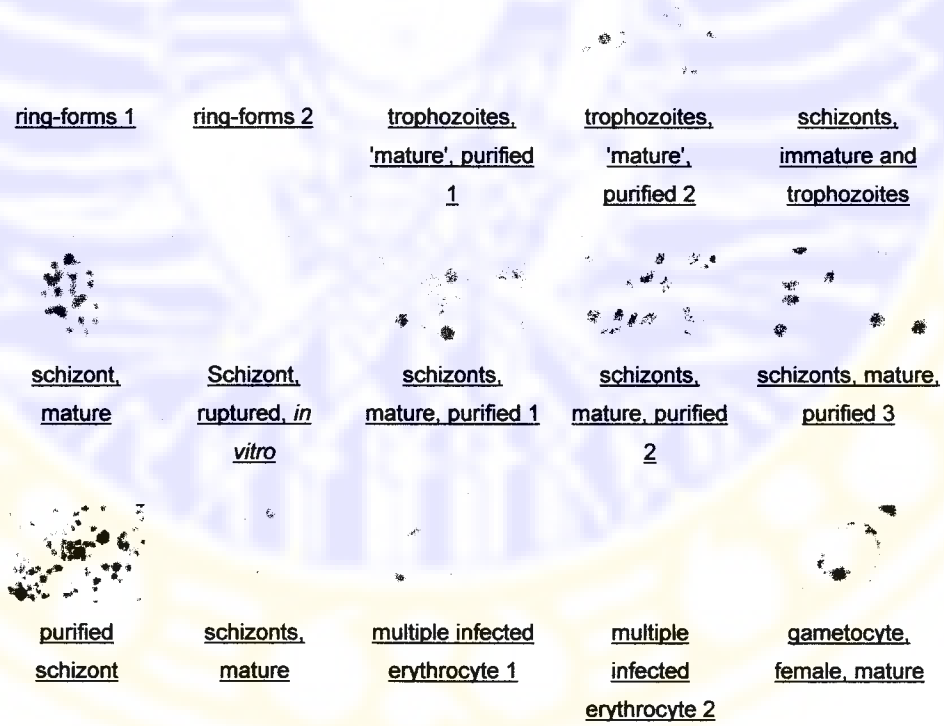
  Terdiri ganet jantan (mikrogamet) dan gamet betina (makrogamet); kedua sel ini bias mengadakan fertilisasi atau pembuahan didalam lambung nyamuk vektornya.
- Bentuk zigot

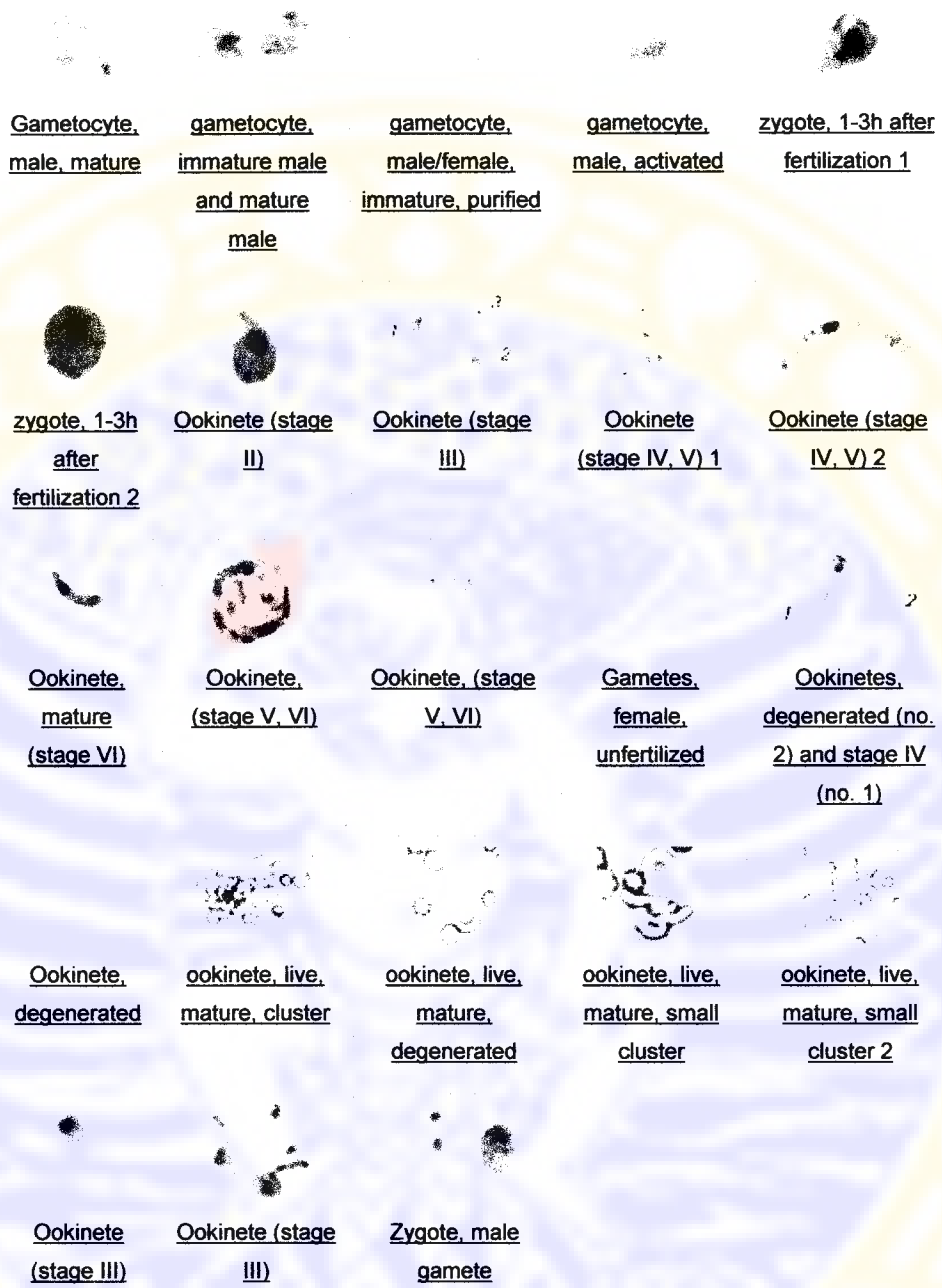
  Makrogamet yang telah dibuahi oleh mikrogamet.
- Bentuk ookinet

  Zigot yang menunjukkan kemampuan bergerak
- Bentuk ookista

  Ookinet yang bentuknya menjadi bulat, dan dikelilingi oleh dinding kista.

Bentuk dan macamnya dapat dilihat pada gambar berikut :






Gambar 2.5 Morfologi *Plasmodium berghei* yang dilihat dengan mikroskop cahaya (LUMC, 2002)

### 2.7.3 Pembiakan *in vivo Plasmodium berghei*

Rodensia yang sering digunakan untuk percobaan (mencit, tikus, hamster) umumnya sensitive terhadap infeksi *Plasmodium berghei* baik lewat gigitan nyamuk maupun injeksi dengan darah yang terinfeksi. Penginfeksian dengan

menggunakan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* pada mencit bisa dilakukan semenjak hari ke-14 setelah nyamuk tesebut menggigit inang yang terinfeksi, sampai beberapa minggu sesudahnya. Seperti telah dikatakan diatas bahwa pada kelenjar ludah nyamuk terdapat sekitar 11.000 sporozoit dan hanya 20-50 saja yang masuk dalam tubuh inang lewat gigitan nyamuk. Pada strain rodensia yang berbeda kepekaan terhadap infeksinya memilik perbedaan yang cukup besar, sehingga jumlah nyamuk yang dibutuhkan untuk penginfeksian berbeda- beda pula untuk setiap strain. Sporozoit bisa ditemukan dalam sel hati mulai beberapa menit sampai beberapa jam setelah inokulasi, sedangkan laju pembelahan aseksual dalam darah untuk *Plasmodium berghei* berdasarkan penelitian relatif stabil, yaitu kira-kira 10 x pembelahan setiap 24 jam saat fase pertama siklus eritrostatik.

Penginfeksian secara buatan dilakukan secara *intravena* atau *intraperitonial* dengan menginjeksikan erirosit yang mengandung bentukan fase aseksual eritrositiknya (cincin,tropozoit, dan skizon). Prosedur rutin yang banyak digunakan para peneliti adalah dengan mengambil darah dari ekor hewan yang terinfeksi dengan parasitemia lebih dari 20 % dan menyuntikkan $10^5 - 10^6$ erirosit terinfeksi pada hewan coba secara *intraperitonial*. Berdasarkan pengalaman, sekitar 10 % dari parasit yang disuntikkan berhasil hidup dan memasuki peredaran darah. Dengan melihat laju pembelahan *Plasmodium berghei* (strain ANKA) pada mencit yang berkisar 10 kali tiap 24 jam dalam fase pertama siklus erirositiknya, maka bisa diperkirakan parasitemia yang didapatkan dengan penginjeksian dosis eritrosit terinfeksi yang berbeda. (Universitas Leiden, 2002)

## 2.8 Tinjauan tentang Alkaloid

### 2.8.1 Alkaloid secara Umum

Alkaloid merupakan golongan metabolit sekunder yang terbesar. Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang nengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering beracun bagi manusia namun juga banyak memberikan manfaat farmakologi, sehingga sering digunakan luas di bidang pengobatan. Alkaloid biasanya tak

berwarna, seringkali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal. Alkaloid yang terdapat pada daun atau buah segar biasanya berasa pahit.

Karena kelarutan dan sifat tiap jenis alkaloid berbeda maka cara ekstraksinya biasanya juga berbeda. Namun secara umum ada suatu cara untuk mengekstraksi alkaloid dari tumbuhan , walaupun belum tentu optimal. Sebagai basa, biasanya alkaloid diekstraksi dari tumbuhan dengan pelarut alkohol yang bersifat asam lemah, kemudian diendapkan dengan amonia pekat. Pemurnian selanjutnya dapat menggunakan ekstraksi cair-cair (Harborne, 1987)

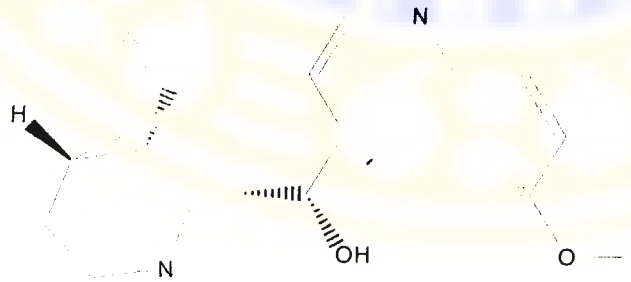
Untuk identifikasi alkaloid biasanya menggunakan uji KLT dan pereaksi kimia. Pereaksi kimia yang sering digunakan adalah pereaksi Mayer, Marquis dan Bauchardat. Penampak noda yang digunakan untuk uji KLT adalah pereaksi Dragendorf. Dengan pereaksi Dragendorf alkaloid biasanya menghasilkan noda jingga coklat dengan latar belakang kuning.

Pereksi Dragendorf dapat dibuat dengan cara sebagai berikut:

1. Dilarutkan 0,85 gram Bismuth subnitrat dalam campuran 10 ml asam asetat dan 40 ml air.
2. Dilarutkan 8 gram KI dalam 20 ml air.
3. Kedua larutan di atas dicampur homogen.
4. Sebelum disemprotkan 1 ml campuran di atas dicampur dengan 2 ml asam asetat dan 10 ml air (Touchstone, 1983).

### 2.8.2 Alkaloid sebagai Antimalaria

Alkaloid merupakan senyawa yang telah lama digunakan sebagai antimalaria. Kulit batang *Cinchona spec.* (kina) suku Rubiaceae telah dikenal sebagai obat antimalaria sejak abad ke 17, dan pada 1820 telah berhasil diisolasi zat aktif sebagai antimalaria ialah : alkaloid dengan inti kuinolina yaitu kinin.




Gambar 2.6 Struktur Kinin

Tidak hanya alkaloid dengan inti kuinolin yang dapat digunakan sebagai antimalaria. Ada juga alkaloid dengan inti isokuinolin yang dapat digunakan sebagai antimalaria yaitu piknamina yang terdapat dalam *Triclisia patens* suku Menispermaceae yang digunakan sebagai antimalaria di Sierra Leone.

Ada juga alkaloid golongan indol yang efektif sebagai sebagai antimalaria. Senyawa 4-metoksi –1- vinil-β-karbolina yang terdapat dalam *Picrasma javanica*. Di Indonesia *Picrasma javanica*. Di samping itu ada pula alkaloid golongan akridona yang digunakan sebagai antimalaria. Di Taiwan, *Citrus grandis* suku Rutacaea digunakan sebagai obat antimalaria, di mana senyawa aktifnya atafilinina menunjukkan aktifitasnya terhadap *Plasmodium berghei* dalam mencit (Masroerah dan Sutaryo, 1994).

## 2.9 Tinjauan tentang Kromatografi

### 2.9.1 Kromatografi secara Umum

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan yang memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan memurnikan komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Pemisahan dalam kromatografi ditunjang oleh adanya fase diam dan fase gerak. Prinsip dari kromatografi adalah proses penarikan komponen zat berkhasiat dan zat lain yang ada di fase diam oleh fase gerak yang berdasarkan proses partisi, adsorbsi, dan pertukaran ion. Kromatografi terbagi menjadi kromatografi kolom dan kromatografi planar. Berdasar fase geraknya kromatografi kolom terbagi menjadi kromatografi cair dan kromatografi gas (Skoog, 1985). Kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi gas. Sebagai zat penyerap selain kertas digunakan juga zat penyerap berpori misalnya alumunium oksida yang diaktifkan, asam silikat atau silikatgel, kiselgur, dan harsa sintetis. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya lebih berguna untuk uji identifikasi karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit ( Anonim, 1979).

Tidak hanya alkaloid dengan inti kuinolin yang dapat digunakan sebagai antimalaria. Ada juga alkaloid dengan inti isokuinolin yang dapat digunakan sebagai antimalaria yaitu piknamina yang terdapat dalam *Triclisia patens* suku Menispermaceae yang digunakan sebagai antimalaria di Sierra Leone.

Ada juga alkaloid golongan indol yang efektif sebagai sebagai antimalaria. Senyawa 4-metoksi -1- vinil-β-karbolina yang terdapat dalam *Picrasma javanica*. Di Indonesia *Picrasma javanica*. Di samping itu ada pula alkaloid golongan akridona yang digunakan sebagai antimalaria. Di Taiwan, *Citrus grandis* suku Rutacaea digunakan sebagai obat antimalaria, di mana senyawa aktifnya atafilinina menunjukkan aktifitasnya terhadap *Plasmodium berghei* dalam mencit (Masroerah dan Sutaryo, 1994).

## 2.9 Tinjauan tentang Kromatografi

### 2.9.1 Kromatografi secara Umum

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan yang memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan memurnikan komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Pemisahan dalam kromatografi ditunjang oleh adanya fase diam dan fase gerak. Prinsip dari kromatografi adalah proses penarikan komponen zat berkhasiat dan zat lain yang ada di fase diam oleh fase gerak yang berdasarkan proses partisi, adsorbsi, dan pertukaran ion. Kromatografi terbagi menjadi kromatografi kolom dan kromatografi planar. Berdasar fase geraknya kromatografi kolom terbagi menjadi kromatografi cair dan kromatografi gas (Skoog, 1985). Kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi gas. Sebagai zat penyerap selain kertas digunakan juga zat penyerap berpori misalnya alumunium oksida yang diaktifkan, asam silikat atau silikatgel, kiselgur, dan harsa sintetis. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya lebih berguna untuk uji identifikasi karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit ( Anonim, 1979).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

digunakan adalah prinsip adsorbsi dan partisi. Sebagai fase diam digunakan zat padat dan fase gerak digunakan zat cair.

Kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk menungkatkan laju aliran fase gerak. Kolom kromatografi dikemas kering biasanya dengan penyerap mutu KLT 10-40 µm dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Eluasi dilakukan dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dari pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettmann, 1995).

# BAB III
# KERANGKA KONSEPTUAL

## 3.1 Landasan Teoritik

a. Malaria masih merupakan salah satu penyakit yang berbahaya di dunia termasuk di Indonesia (WHO, 2004) ( Mursito, 2002). Telah banyak dilaporkan resistensi parasit Plasmodium terhadap obat antimalaria yang selama ini digunakan, misalnya resistensi terhadap klorokuin, primakuin, pirimetamin,dll (CDC, 2004)

b. Masalah resistensi tersebut harus diupayakan penemuan obat antimalaria baru yang masih sensitif terhadap parasit malaria. Upaya penemuan tersebut dapat berasal dari bahan alam maupun sintetis. Namun upaya penemuan tersebut lebih diarahkan ke bahan alam dengan alasan sumber bahan alam lebih banyak tersedia, murah, serta efek sampingnya lebih kecil (Wijisekera,1991).

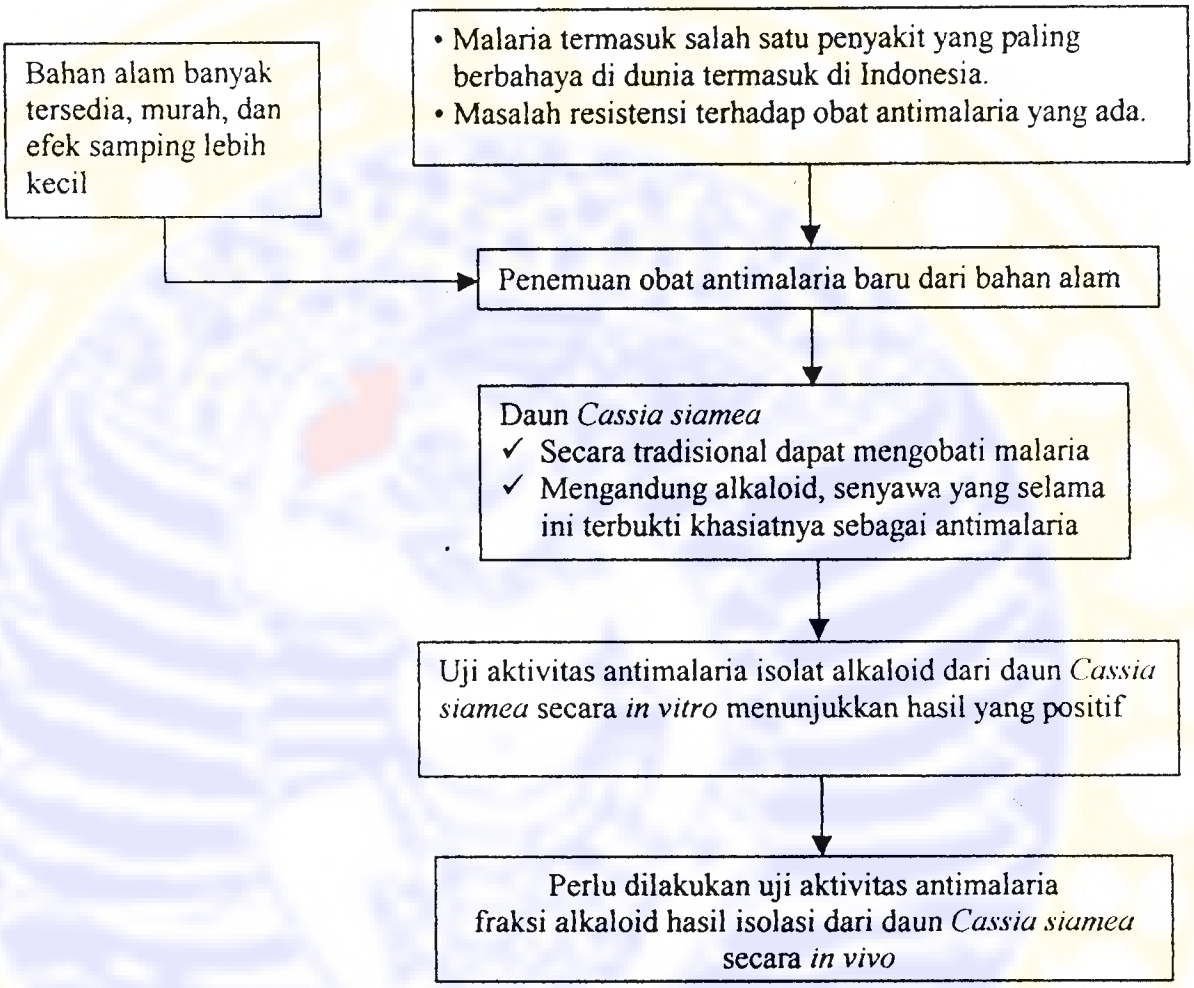
c. Usaha penemuan obat antimalaria dari bahan alam mengacu pada tanaman yang secara etnofarmakologi berkhasiat sebagai antimalaria ( Masroerah dan Sutaryo, 1994)

d. Daun *Cassia siamea* secara etnofarmakologi dikenal berkhasiat sebagai antimalaria (Soedibyo,1998). Telah banyak dilakukan penelitian ilmiah untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari tumbuhan *Cassia siamea.* Namun para peneliti tersebut belum mengarahkan penelitiannya pada senyawa tertentu dari tanaman ini yang mempunyai aktivitas sebagai antimalaria.

e. Daun *Cassia siamea* diketahui mengandung senyawa alkaloid (Depkes RI, 1989). Alkaloid secara farmakologi dikenal dapat mengobati malaria (Mursito 2002). Ekasari ( 2001 ) berhasil mengekstraksi dan mengisolasi kemudian menguji aktivitas isolat alkaloid daun *Cassia siamea* secara *in vitro*. Hasil penelitian memberikan data bahwa isolat alkaloid daun *Cassia siamea* cukup efektif mengobati malaria yaitu dengan memberikan harga $IC_{50}$ sebesar 0,24 μg/ml.

f. Untuk itu perlu dilakukan uji aktivitas antimalaria fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* secara *in vivo* agar dapat mengetahui efektivitasnya secara langsung terhadap kondisi parasit di tubuh inang.

### 3.2 Skema Kerangka Konseptual




Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

# BAB IV
# METODE PENELITIAN

## 4.1 Bahan Penelitian

Selama penelitian ini berlangsung, bahan-bahan yang digunakan antara lain:

1. Daun Johar (*Cassia siamea*) yang diperoleh dan dideterminasi di Kebun Raya Purwodadi Jawa Timur tanggal 6 Juni 2004.
2. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi antara lain n-heksana, kloroform, etanol, asam tartrat, $NH_4OH$, dan aquadest.
3. *Plasmodium berghei* strain ANKA yang didapat dari Lembaga Biomolekuler Eijkmann, Jakarta dan dikembangbiakkan di laboratorium hewan Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya.
4. Mencit jantan galur Balb-C umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 g yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya.
5. Bahan pembanding (kontrol positif) yang digunakan dalam penelitian ini adalah klorokuin difosfat (Sigma C- 6628, 25 gram, lot 7740650)
6. Bahan lain yang digunakan untuk uji antimalaria secara *in vivo* adalah medium *Alceiver*, pewarna *Giemsa*, metanol absolut, CMC Na.

## 4.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain: penyerbuk, neraca kasar, wadah maserasi, pengaduk, erlemeyer, corong Buchner, kertas saring, rotavapour, wadah tampungan, cawan porselen, corong pisah, neraca analitik, sintered glass, pompa vakum, erlenmeyer, tabung reaksi, vial, bak kromatografi, lempeng kromatografi, silica gel, pipet, mikropipet, lampu ultraviolet, penyemprot, hairdryer, corong, pipet tetes, gelas ukur, vial, labu ukur , pipet volume, alat sonde, lemari pendingin,neraca analitik, syringe dan jarum suntik, mikroskop dan gelas obyek.

## 4.3 Metode Ekstraksi dan Isolasi

### 4.3.1 Metode Ekstraksi

Daun yang segar dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung. Daun yang telah kering digiling hingga

diperoleh serbuk daun halus. Serbuk daun halus sebanyak 3,5 kilogram direndam dengan menggunakan pelarut n-heksana sampai semuanya cukup terendam. Hasil rendaman setiap 24 jam disaring dengan corong Buchner yang diberi kertas saring. Hasil saringan (ampas) direndam kembali dengan n-heksana. Proses maserasi ini dilakukan berulang-ulang (remaserasi) sampai kandungan lemak dan klorofilnya diperkirakan sudah habis, ditandai dengan filtrat mulai jernih. Jika maserasi dengan heksan dirasa sudah cukup, serbuk dikeringkan sampai bebas n-heksana. Proses maserasi dilanjutkan kembali dengan pelarut etanol 90% dalam asam tartrat 1%, didiamkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 24 jam, dilakukan penyaringan dengan corong Buchner untuk mendapatkan filtratnya. Setelah itu dilakukan penguapan filtrat dengan menggunakan rotavapor sampai volume 1/3nya dari volume total. Ekstrak yang kental dibasakan dengan menggunakan $NH_4OH$ sampai suasana pH 8. Setelah pembasaan, dengan segera dilakukan penarikan dengan pelarut kloroform. Jumlah kloroform yang digunakan sebanyak 3 kali dari volume ekstrak, metode yang dilakukan dengan cara mengocok campuran tersebut selama 15 menit dengan menggunakan corong pisah. Setelah dikocok, didiamkan sampai adanya pemisahan. Setelah ada pemisahan, fase bagian bawah (kloroform) ditampung. Hasil tampungan fase kloroform kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapour. Ekstrak kental yang dihasilkan dari rotavapor tersebut diuapkan dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak yang cukup kering.

**4.3.2 Metode Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Vakum**

Fase diam : Silika gel 60G (<45 μm)

Fase gerak : n heksana– kloroform – etanol dengan graduasi 10 %

Cara kerja

1. Alat kromatografi kolom vakum dirangkai. Sintered glass dipasang pada labu erlenmeyer yang telah dihubungkan dengan pompa vakum.
2. Ditimbang silika gel 60G (<45μm) dalam jumlah tertentu, misal a gram.
3. Silika gel dimasukkan ke dalam sintered glass sambil ditekan-tekan dalam keadaan pompa vakum dihidupkan.

4. Dihentikan sampai ketinggian 4-5 cm. Ditimbang silika gel 60G (<45 μm) yang tersisa, misal b gram.
5. Jumlah fase diam yang digunakan sebesar ( a-b ) gram.
6. Dilakukan pembasahan fase diam sekaligus tes cracking dengan menggunakan eluen pertama.
7. Ditimbang ekstrak kloroform seberat 5-10% dari jumlah fase diam yang digunakan.
8. Ditimbang silika gel 60G (63-200 μm) seberat dua sampai tiga kali jumlah ekstrak yang digunakan.
9. Ekstrak yang sudah ditimbang dilarutkan dalam pelarut yang sesuai secukupnya, kemudian dicampur dengan silika yang sudah ditimbang lalu dirotavapour.
10. Hasil rotavapour yaitu campuran ekstrak dan silika yang sudah kering serta homogen ditaburkan di atas fase diam yang sudah diuji tes cracking. Di atasnya ditaburkan silika secukupnya dan diberi kertas saring
11. Dilakukan eluasi dengan menggunakan eluen yang pertama. Volume eluasi disesuaikan dengan jumlah fase diam. Setelah eluasi dengan pertama selesai dilanjutkan eluen berikutnya
12. Hasil tiap kali eluasi ditampung dalam wadah yang berbeda.
13. Dilakukan identifikasi alkaloid tehadap fraksi-fraksi yang dihasilkan dengan dilakukan uji KLT.
14. Fraksi-fraksi yang positif alkaloid dikelompokkan (fraksi alkaloid) kemudian dilakukan kromatografi kolom terbuka

Tabel IV.1 Eluen yang digunakan pada kromatografi kolom vakum

| Fraksi nomor | Komposisi eluen (%) | | |
|---|---|---|---|
| | n-heksana | kloroform | etanol |
| 1 | 100 | - | - |
| 2 | 90 | 10 | - |
| 3 | 80 | 20 | - |
| 4 | 70 | 30 | - |
| 5 | 60 | 40 | - |
| 6 | 50 | 50 | - |
| 7 | 40 | 60 | - |
| 8 | 30 | 70 | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 9 | 20 | 80 | - |
| 10 | 10 | 90 | - |
| 11 | - | 100 | - |
| 12 | - | 95 | 5 |
| 13 | - | 90 | 10 |
| 14A | - | 85 | 15 |
| 14B | - | 82,5 | 17,5 |
| 15A | - | 80 | 20 |
| 15B | - | 77,5 | 22,5 |
| 16A | - | 75 | 25 |
| 16B | - | 72,5 | 27,5 |
| 17A | - | 70 | 30 |
| 17B | - | 65 | 35 |
| 18 | - | 60 | 40 |
| 19 | - | 50 | 50 |
| 20 | - | 40 | 60 |
| 21 | - | 30 | 70 |
| 22 | - | 20 | 80 |
| 23 | - | 10 | 90 |
| 24 | - | - | 100 |

**4.3.3 Metode Identifikasi Alkaloid dengan Kromatografi Lapis Tipis.**

Fase diam : silica gel GF 254

Fase gerak : kloroform-etanol (9 : 1)

Penampak noda : Dragendorf

Adanya alkaloid ditandai oleh adanya noda berwarna jingga pada plat KLT setelah disemprot dengan penampak noda Dragendorf.

**4.3.4 Metode Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka**

Fase diam : silika gel 60G ( 63-200μm )

Fase gerak : n-heksana

n- heksana-kloroform 5 : 5

kloroform

eluen hasil optimasi

etanol

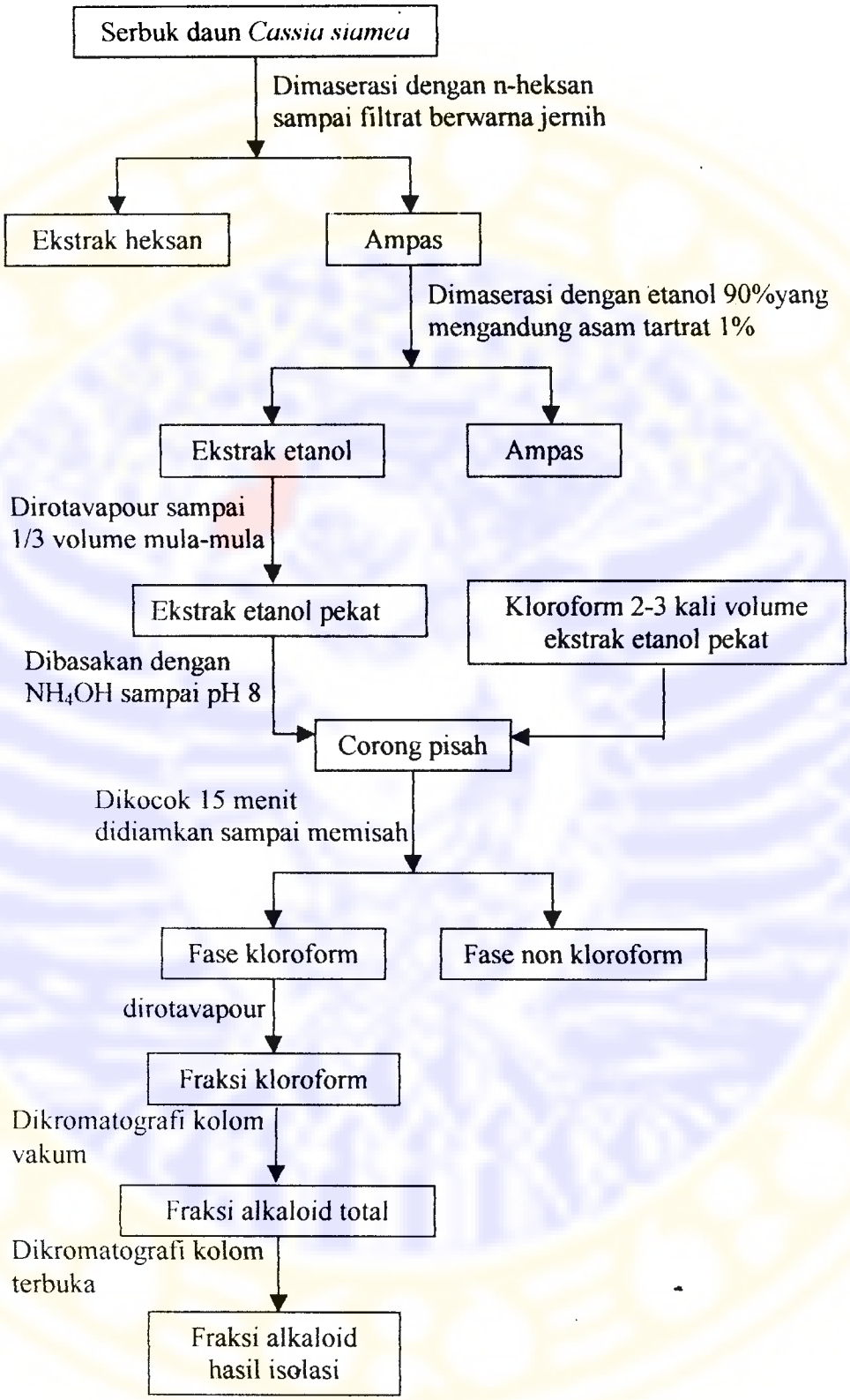
Cara kerja:

1). Ditimbang silika gel sebanyak 50 g. Diambil eluen pertama (n-heksana) sebanyak 3 kali dari jumlah silika.

2). Silika gel masukkan labu erlenmeyer, tambahkan eluen, dikocok selama 15 menit
3). Silika gel dan eluen tersebut dituangkan ke dalam kolom.
4). Eluen dituangkan ke dalam kolom sampai penuh, ditutup dengan aluminium foil, dibiarkan semalam. Jumlah eluen yang digunakan harus tetap terukur.
5). Ditimbang fraksi alkaloid hasil kromatografi kolom vakum sebanyak 1-2 % dari jumlah silika gel yang digunakan. Lalu ekstrak dilarutkan dengan pelarut organik secukupnya kemudian dicampur dengan silika, dicampur sampai homogen dan kering.
6). Eluen dialirkan sampai permukaannya 0,5 cm di atas permukaan silika gel. Diukur jumlah volume kolom = volume eluen mula-mula – volume eluen yang sudah dialirkan.
7). Fraksi alkaloid total yang sudah dikeringkan dengan silika gel dimasukkan ke dalam kolom (di atas permukaan silika gel) lalu ditambahkan eluen kira-kira setinggi 3 cm. Kemudian di atasnya diberi silika kering setinggi 2 cm dan kertas saring
8). Ditambahkan eluen yang pertama. Dilakukan penetesan dengan kecepatan 1 tetes per detik. Ditampung dalam vial-vial tiap volume tertentu.
9). Jika eluen pertama telah selesai, diganti eluen kedua. Begitu seterusnya sampai eluen terakhir. Dilakukan identifikasi alkaloid terhadap fraksi-fraksi yang dihasilkan dengan menggunakan uji KLT.
10). Fraksi-fraksi yang mengandung alkaloid lebih murni dikelompokkan dan siap diujikan.

Tabel IV.2 Eluen yang digunakan pada kromatografi kolom terbuka

| Fraksi nomor | Ditampung tiap | Eluen |
|---|---|---|
| 1-25 | 10 ml | n-heksana 250 ml (1 kali volume kolom) |
| 26-50 | 10 ml | n-heksana-kloroform (50 : 50) sebanyak 250 ml (1 kali volume kolom) |
| 51-75 | 10 ml | Kloroform 250 ml (1 kali volume kolom) |
| 75-225 | 5 ml | Kloroform-etanol (85 : 15) sebanyak 750 ml (3 kali volume kolom) |
| 225-250 | 10 ml | Etanol 250 ml (1 kali volume kolom) |




Gambar 4.1 Skema ekstraksi dan isolasi alkaloid dari daun *Cassia siamea*

### 4.4 Metode Uji Aktivitas Antimalaria secara *in vivo*

#### 4.4.1 Penyiapan *Plasmodium berghei* untuk penginfeksian mencit donor.

Penginfeksian mencit donor dilakukan dengan menggunakan simpanan beku darah yang telah terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam medium alceiver (1:3). Simpanan beku darah mula-mula diturunkan suhunya sesuai dengan suhu kamar dengan cara dihangatkan dalam telapak tangan sambil diputar-putar (dithawing). Setelah suhunya telah sesuai dengan suhu kamar sediaan tersebut diinjeksikan secara intraperonial pada mencit sebanyak 100-200 µl kemudian ditunggu sampai tingkat parasitemia dalam mencit tersebut mencapai ±20%. Bila prosen parasitemia telah mencukupi kemudian dilakukan pengambilan darah untuk penginfeksian pada mencit coba.

#### 4.4.2 Penyiapan *Plasmodium berghei* untuk penginfeksian mencit coba

Mencit yang akan digunakan dalam pengujian ekstrak dibagi atas 8 kelompok, yaitu 6 kelompok coba dan 2 kelompok kontrol (positif dan negatif). Sebelum dilakukan pengujian sebelumnya mencit tersebut harus diinfeksi terlebih dahulu. Mencit donor yang sudah memiliki prosen parasitemia sekitar 20% dibedah, setelah itu diambil darah dari jantungnya. Darah yang didapat kemudian diencerkan dengan medium alceiver (1:3). Setelah itu baru diinfeksikan sebanyak 100-200 µl secara intraperitonial pada semua mencit. Kemudian ditunggu dan diamati setiap hari prosen parasitemianya. Bila prosen parasit telah mencapai 1-5 % maka uji aktivitas antimalaria dapat dimulai.

#### 4.4.3 Pembuatan preparat darah

Pembuatan preparat darah dapat dilakukan sebagai berikut :

Pada gelas obyek mikroskop diteteskan 1 tetes darah dari vena ekor mencit . Tetesan suspensi diratakan dengan menggunakan bantuan satu sisi gelas obyek yang lain. kemudian tunggu beberapa saat sampai mengering di udara terbuka. Setelah kering hapusan tipis tersebut difiksasi dalam metanol absolut selama 1 menit. Dan dikeringkan di udara terbuka. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan pewarna Giemsa dalam dapar. Setelah itu cuci bersih dengan air yang mengalir dan keringkan. Diamati sediaan hapusan darah tipis dengan menggunakan

mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Untuk parasit malaria inti berwarna merah dan plasma berwarna biru sedangkan sel darah berwarna merah muda, titik *"Schuffner"* berwarna merah tua.

### 4.4.4 Penghitungan Parasitemia

Parasitemia merupakan perbandingan antara sel darah merah yang terinfeksi parasit malaria terhadap sel darah merah total yang teramati. Jumlah parasit dilakukan pada tiap 5000 eritrosit.

## 4.5 Uji Aktivitas Antimalaria

### 4.5.1 Penyiapan Bahan Uji

Sebagai bahan uji adalah fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun johar *Cassia siamea* yang dibuat dengan dosis 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; dan 0,15625 mg/kg BB. Dengan asumsi bahwa berat badan standar mencit adalah 25 gram dan volume tiap pemberian adalah 250 µl, maka perhitungan dosis didasarkan atas berat badan tersebut, dan bila mencit yang diuji memiliki berat badan yang lebih atau kurang dari berat standar maka dilakukan konversi sesuai dengan ekivalennya.

- Ditimbang ekstrak kering sebanyak 12,5 mg, kemudian dibuat sediaan suspensi dengan menambahkan CMC Na 0,5% sampai 25,0 ml (5 mg/kg BB).
- Dipipet dari suspensi 5 mg/kg BB sebanyak 12,5 ml dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai 25 ml (2,5 mg/kg BB).
- Dipipet dari suspensi 2,5 mg/kg BB sebanyak 12,5 ml dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai 25 ml (1,25mg/kg BB).
- Dipipet dari suspensi 1,25 mg/kg BB sebanyak 12,5 ml dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai 25 ml (0,625mg/kg BB).
- Dipipet dari suspensi 0,625 mg/kg BB sebanyak 12,5 ml dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai 25 ml (0,3125mg/kg BB).
- Dipipet dari suspensi 0,3125 mg/kg BB sebanyak 12,5 ml dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai 25 ml (0,15625 mg/kg BB).

Sebagai kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan dosis 10 mg/kg BB. Sebagai kontrol negatif digunakan larutan CMC Na 0,5% dalam aquadest.

### 4.5.2 Pengujian Aktivitas Antimalaria secara In vivo

Seluruh mencit yang digunakan dalam penelitian telah mencapai tingkat parasitemia antara 1-5% maka pengujian aktivitas antimalaria dapat dimulai. Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor mencit untuk dihitung jumlah parasitemianya. Ekstrak uji yang terdiri dari bermacam-macam dosis disiapkan beserta alat sondenya. Pada pengujian, masing-masing kelompok akan mendapatkan larutan uji sesuai dengan dosis yang ditentukan. Pemberian larutan fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun johar *Cassia siamea* secara peroral dilakukan pada hari ke-0 (D0) sampai hari ke-3 (D3). Pengambilan sampel darah dari ekor mencit dilakukan setiap hari sebelum mencit diberi perlakuan dan dibuat hapusan tipis untuk mengamati perkembangan aksi obat. kelompok kontrol positif mendapatkan larutan klorokuin difosfat dengan dosis 10 mg/kg BB sedangkan kelompok kontrol negatif mendapat larutan CMC Na 0,5%.

1. Perhitungan jumlah parasit

   Dari hapusan darah tipis diamati jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit malaria setiap 5000 eritrosit (% parasitemia). Kemudian dihitung % pertumbuhan dan persen penghambatan dengan cara perhitungan sebagai berikut

$$\% \text{ pertumbuhan} = \frac{P(d_1 - d_0) + P(d_2 - d_1) + P(d_3 - d_2) + \ldots + P(d_6 - d_5)}{6}$$

$P(d_x - d_{x-1})$ = % parasitemia hari x dikurangi % parasitemia hari sebelumnya

$$\% \text{ Parasitemia} = \left( \frac{\Sigma \text{ eritrosit yang terinfeksi}}{5000 \text{ eritrosit}} \right) \times 100\ \%$$

$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - [Xp/Xk \times 100\%]$$

Xp = % Pertumbuhan Plasmodium berghei yang dihasilkan bahan uji.

Xk = % Pertumbuhan yang dihasilkan kontrol negatif.

2.Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis probit yang digunakan untuk menghitung $ED_{50}$ (dosis fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun johar yang mampu menghambat pertumbuhan P. berghei sebesar 50%).

Untuk menghitung $ED_{50}$ sebaiknya menggunakan data % pertumbuhan dari hari ke 0 (D0) sampai hari ke 4 (D4). Tetapi untuk mengetahui sejauh mana perkembangan aksi obat tersebut (profil obat) maka dapat menggunakan data sampai hari ke 6 (D6).

# BAB V
# HASIL PENELITIAN

## 5.1 Hasil Ekstraksi

Daun *Cassia siamea* segar dikeringkan terlebih dulu untuk kemudian diserbuk. Sebanyak 2301 gram serbuk daun dimaserasi sebanyak 35 kali dengan menggunakan pelarut n-heksana. Volume pelarut yang dibutuhkan untuk tiap kali perendaman ± 4,5 liter. Setelah ekstraksi selesai diperoleh ekstrak heksana seberat 388 gram.

Ampas sebanyak 1.876 gram kemudian diekstraksi lagi dengan menggunakan pelarut etanol 90 % yang mengandung 1 % asam tartrat dengan tujuan menarik alkaloid dalam bentuk garam. Ekstraksi dilakukan sampai 10 kali, hasil yang diperoleh kemudian dipekatkan sampai kira-kira 1/3 – 1/4 dari volume semula.

Ekstrak etanol yang sudah pekat kemudian dibasakan dengan penambahan $NH_4OH$ 2,5% sampai diperoleh pH 8. Selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut kloroform dengan tujuan menarik alkaloid dalam bentuk basa. Dihasilkan dua fase, fase etanol di bagian atas serta fase kloroform di bagian bawah. Fase kloroform yang terletak di bagian bawah ditampung kemudian dikeringkan sehingga kemudian diperoleh fraksi kloroform seberat 97 gram.

## 5.2 Hasil Kromatografi Kolom Vakum

Sebanyak 5,2 gram ekstrak kloroform difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum. Fraksinasi dilakukan sampai tiga kali, sehingga fraksi kloroform yang digunakan secara keseluruhan adalah 15,6 gram. Fase gerak yang digunakan merupakan kombinasi n-heksana, kloroform, dan etanol. Fraksi-fraksi yang positif alkaloid selanjutnya dikelompokkan sehingga didapatkan tiga fraksi.

Tabel V.1 Fraksi alkaloid yang dihasilkan dari kromatografi kolom vakum

| | | Eluen | Hasil |
|---|---|---|---|
| Fraksi I | Fraksi 14A | Kloroform-etanol (85 : 15) | 1,6432 gram |
| | Fraksi 14B | Kloroform-etanol (82,5 : 17,5) | |
| Fraksi II | Fraksi 15A | Kloroform-etanol (80 : 20) | 1,5818 gram |
| | Fraksi 15B | Kloroform-etanol (77,5 : 22,5) | |
| Fraksi III | Fraksi 16A | Kloroform-etanol (75 : 25) | 4,0199 gram |
| | Fraksi 16B | Kloroform-etanol (72,5 : 17,5) | |
| | Fraksi 17A | Kloroform-etanol (70 : 30) | |
| | Fraksi 17B | Kloroform-etanol (65 : 35) | |
| | Fraksi 18 | Kloroform-etanol (60 : 40) | |

Berdasarkan profil KLT, fraksi III memiliki kandungan alkaloid yang lebih murni dibandingkan dua fraksi yang lain sehingga pada tahap fraksinasi selanjutnya dengan kromatografi kolom terbuka yang akan digunakan adalah fraksi III

**5.3 Hasil Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka**

Tahap selanjutnya adalah fraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka. Sebanyak 1 gram fraksi III yang dilapiskan di atas permukaan fase diam, selanjutnya dieluasi dengan lima macam pelarut. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom terbuka selanjutnya dikelompokkan berdasar profil KLTnya sehingga diperoleh tiga macam fraksi.

Tabel V.2 Fraksi alkaloid yang dihasilkan dari kromatografi kolom terbuka

| | | |
|---|---|---|
| Fraksi A | Fraksi 107, 108, 109 | Hasil 12,11 mg |
| Fraksi B | Fraksi 110, 111, 112, 113,114 | Hasil 16,99 mg |
| Fraksi C | Fraksi 115, 116, 117, 118, 119 | Hasil 2,10 mg |

Dari ketiga fraksi akan dipilih fraksi yang lebih memiliki aktivitas antimalaria. Untuk mengetahuinya dilakukan uji aktivitas antimalaria orientasi Hasil uji orientasi (lampiran) menunjukkan fraksi B lebih efektif menghambat

malaria sehingga fraksi alkaloid hasil isolasi yang akan diteliti aktivitas antimalarianya adalah fraksi B.

**5.4 Hasil Identifikasi Alkaloid**

Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis

Tiga fraksi yaitu fraksi A, fraksi B, dan fraksi C diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan :

Fase diam : kiesel gel 60 GF E Merck

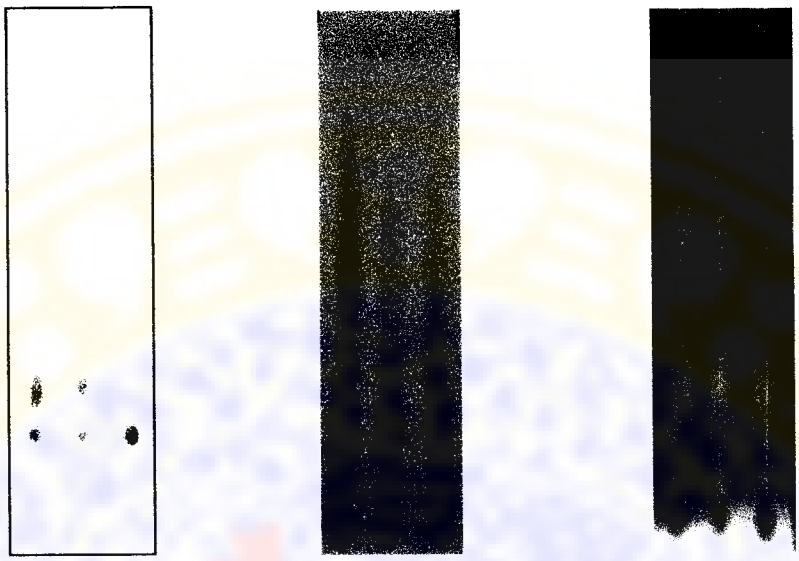
Fase gerak : kloroform-etanol = 9 : 1

Penampak noda : sinar UV 254 nm dan 365 nm serta pereaksi dragendroff.

Hasil identifikasi ketiga fraksi tersebut dapat dilihat pada tabel dan gambar di bawah berikut

Tabel V.3 Noda alkaloid yang terdapat pada fraksi alkaloid hasil isolasi

| | Rf | Warna (setelah disemprot dragendorf) |
|---|---|---|
| Fraksi A | 0,443 | jingga |
| | 0,316 | jingga |
| Fraksi B | 0,443 | jingga |
| | 0,316 | jingga |
| Fraksi C | 0,443 | jingga |
| | 0,316 | jingga |




Gambar 5.1 Gambar 5.2 Gambar 5.3

Gambar 5.1: Profil KLT fraksi A, B, dan C ditambah pereaksi Dragendorf

Gambar 5.2: Profil KLT fraksi A, B, dan C diamati dengan sinar UV 254 nm

Gambar 5.3: Profil KLT fraksi A, B, dan C diamati dengan sinar UV 365 nm

**5.5 Pembuatan Suspensi Uji**

Pelarut yang digunakan untuk membuat suspensi uji adalah larutan CMC Na 0,5% dalam aquadest. Larutan inilah yang digunakan untuk kontrol negatif. Untuk uji aktivitas antimalaria fraksi B digunakan enam macam dosis, yaitu: 5 mg/kg BB; 1 mg/kg BB; 0,5 mg/kg BB; 0,1 mg/kg BB; 0,05 mg/kg BB; 0,01 mg/kg BB. Proses pembuatan suspensi uji adalah sebagai berikut:

- Ditimbang 5 mg fraksi B dibuat sediaan sediaan suspensi dengan menambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 5 mg/kg BB).
- Ditimbang 1 mg fraksi B dibuat sediaan sediaan suspensi dengan menambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 1 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 5 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,5 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 1 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,1 mg/kg BB).

- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 0,5 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,05 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 5 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,01 mg/kg BB).

Untuk mengetahui potensi fraksi alkaloid dari daun *Cassia siamea*, maka harus dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin difosfat yang selama ini dikenal obat standar antimalaria. Sebagai parameter yang dapat dibandingkan adalah $ED_{50}$. Untuk mendapatkan $ED_{50}$ dari klorokuin difosfat, seperti halnya pada fraksi uji mesti dilakukan uji pada beberapa dosis. Dosis yang akan digunakan untuk uji kontrol positif (klorokuin difosfat) adalah 10 mg/kg BB; 5 mg/kg BB; 1 mg/kg BB; 0,5 mg/kg BB; 0,1 mg/kg BB; 0,05 mg/kg BB. Pembuatan larutan uji untuk kontrol positif adalah sebagai berikut:

- Ditimbang 10 mg klorokuin difosfat dibuat sediaan sediaan suspensi dengan menambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 10 mg/kg BB).
- Ditimbang 5 mg fraksi B dibuat sediaan sediaan suspensi dengan menambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 5 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 10 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 1 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 5 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,5 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 1 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,1 mg/kg BB).
- Dipipet 1 ml dari suspensi dosis 0,5 mg/kg BB lalu ditambahkan larutan CMC Na 0,5% ad 10 ml (dosis 0,05 mg/kg BB).

**5.6 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Alkaloid Hasil Isolasi**

Tabel V.4 Persen parasitemia hasil perlakuan fraksi alkaloid dan kontrol negatif

| Dosis (mg/kg BB) | | D0 (%) | D1 (%) | D2 (%) | D3 (%) | D4 (%) | D5 (%) | D6 (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | I | 1,54 | 5,83 | 13,51 | 15,76 | 15,86 | - | - |
| | II | 1,35 | 3,36 | 9,23 | 15,25 | 17,06 | - | - |
| | III | 3,75 | 7,25 | 11,88 | 13,08 | 17,81 | 26,28 | - |
| | IV | 1,32 | 2,47 | 11,96 | 14,79 | 18,38 | - | - |
| | V | 1,03 | 4,44 | 7,68 | 21,73 | 19,56 | - | - |
| 5,00 | I | 2,66 | 3,75 | 4,86 | 6,06 | 7,33 | 10,50 | 12,36 |
| | II | 4,32 | 5,50 | 6,75 | 8,01 | 9,13 | 11,20 | 15,68 |
| | III | 4,86 | 6,00 | 7,25 | 8,46 | 9,46 | 12,10 | - |
| 1,00 | I | 4,19 | 5,49 | 6,66 | 8,73 | 9,30 | 11,44 | 17,77 |
| | II | 1,61 | 3,24 | 4,86 | 6,39 | 7,81 | 11,24 | 13,00 |
| | III | 4,98 | 6,25 | 7,63 | 8,91 | 10,41 | 12,38 | - |
| 0,50 | I | 1,51 | 3,28 | 5,05 | 6,93 | 9,45 | 10,88 | - |
| | II | 1,83 | 3,57 | 5,33 | 7,07 | 9,00 | 16,10 | - |
| | III | 6,61 | 8,54 | 9,99 | 11,21 | 14,18 | 16,55 | 17,65 |
| 0,10 | I | 2,22 | 4,24 | 6,25 | 8,19 | 9,84 | 10,32 | 14,70 |
| | II | 1,39 | 3,25 | 5,05 | 6,93 | 8,85 | 14,79 | 15,05 |
| | III | 3,09 | 4,97 | 6,75 | 8,64 | 10,50 | - | - |
| 0,05 | I | 2,35 | 4,70 | 7,15 | 9,53 | 11,98 | 15,13 | 18,58 |
| | II | 1,53 | 3,90 | 6,11 | 8,42 | 10,74 | 21,43 | - |
| | III | 1,12 | 2,04 | 3,85 | 6,42 | 8,59 | 10,34 | - |
| 0,01 | I | 0,67 | 3,33 | 6,25 | 8,79 | 11,08 | - | - |
| | II | 0,98 | 3,54 | 6,10 | 8,64 | 11,54 | 12,97 | 16,80 |
| | III | 1,02 | 3,96 | 6,72 | 9,57 | 12,40 | - - | - |

Keterangan:

Dosis 0 adalah kontrol negatif

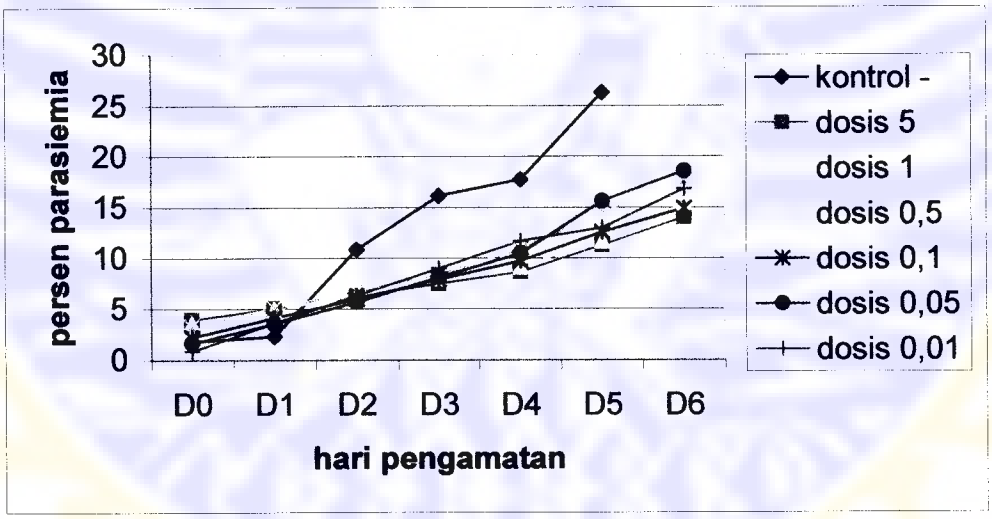
D0-D6 adalah persen parasitemia mulai hari ke-0 sampai hari ke-6

Tabel V.5 Persen parasitemia rata-rata hasil pemberian fraksi alkaloid dan kontrol negatif mulai D0 sampai D6

| | D0 (%) | D1 (%) | D2 (%) | D3 (%) | D4 (%) | D5 (%) | D6 (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| kontrol - | 1,80 | 2,34 | 10,85 | 16,12 | 17,73 | 26,28 | - |
| dosis 5 | 3,95 | 5,08 | 6,29 | 7,51 | 8,64 | 11,27 | 14,02 |
| dosis 1 | 3,59 | 4,99 | 6,38 | 8,01 | 9,17 | 11,69 | 15,39 |
| dosis 0,5 | 3,31 | 5,13 | 6,79 | 8,40 | 10,88 | 14,51 | 17,65 |
| dosis 0,1 | 2,23 | 4,15 | 6,02 | 7,92 | 9,73 | 12,55 | 14,88 |
| dosis 0,05 | 1,67 | 3,55 | 5,70 | 8,12 | 10,44 | 15,63 | 18,58 |
| dosis 0,01 | 0,89 | 3,61 | 6,36 | 9,00 | 11,67 | 12,97 | 16,80 |

Keterangan:

D0-D6 adalah persen parasitemia rata-rata mulai hari ke-0 sampai hari ke-6




Gambar 5.4 Grafik persen parasitemia hasil pemberian fraksi alkaloid dan kontrol negatif mulai D0-D6

Tabel V.6 Persen pertumbuhan dan penghambatan fraksi alkaloid

| Dosis (mg/kg BB) | | Persen pertumbuhan D0-D4 ( % ) | Rerata Persen pertumbuhan D0-D4 ( % ) | Persen penghambatan ( % ) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | I | 3,58 | 4,09 | - |
| | II | 3,93 | | |
| | III | 3,52 | | |
| | IV | 4,27 | | |
| | V | 5,18 | | |
| 5,00 | I | 1,17 | 1,17 | 71,33 |
| | II | 1,20 | | |
| | III | 1,15 | | |
| 1,00 | I | 1,28 | 1,36 | 66,78 |
| | II | 1,55 | | |
| | III | 1,36 | | |
| 0,50 | I | 1,74 | 1,81 | 55,85 |
| | II | 1,79 | | |
| | III | 1,89 | | |
| 0,10 | I | 1,91 | 1,87 | 54,20 |
| | II | 1,87 | | |
| | III | 1,85 | | |
| 0,05 | I | 2,41 | 2,19 | 46,43 |
| | II | 2,30 | | |
| | III | 1,87 | | |
| 0,01 | I | 2,60 | 2,70 | 34,13 |
| | II | 2,64 | | |
| | III | 2,85 | | - |

Keterangan: Dosis 0 adalah kontrol negatif

Data dosis fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* serta persen penghambatannya kemudian dianalisis secara probit. Diperoleh hasil $ED_{50}$ untuk fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* adalah 0,09818 mg/kg BB.

## 5.7 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Klorokuin Difosfat

Tabel V.7 Persen parasitemia hasil perlakuan klorokuin difosfat dan kontrol negatif

| Dosis (mg/kg BB) | | D0 ( % ) | D1 ( % ) | D2 ( % ) | D3 ( % ) | D4 ( % ) | D5 ( % ) | D6 ( % ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | I | 3,26 | 9,09 | 13,60 | 15,65 | 20,93 | 23,33 | 25,93 |
| | II | 2,46 | 9,69 | 10,60 | 12,86 | 20,99 | 27,55 | 30,70 |
| | III | 1,84 | 9,26 | 9,54 | 16,27 | 19,89 | 20,35 | 20,50 |
| 10 | I | 3,84 | 3,13 | 0,99 | 0,98 | 0,96 | 1,10 | 2,94 |
| | II | 1,05 | 0,94 | 0,72 | 0,65 | 0,53 | 0,55 | 1,24 |
| | III | 2,91 | 2,08 | 0,79 | 0,65 | 0,43 | 1,08 | 1,96 |
| 5 | I | 3,14 | 1,82 | 2,99 | 2,05 | 4,75 | 4,56 | 13,33 |
| | II | 3,66 | 2,66 | 1,36 | 4,00 | 5,08 | 6,09 | 10,43 |
| | III | 2,76 | 2,22 | 1,30 | 1,36 | 4,70 | 3,18 | 13,83 |
| 1 | I | 3,34 | 4,07 | 5,42 | 7,42 | 8,71 | 12,58 | 23,03 |
| | II | 3,28 | 5,16 | 6,17 | 9,93 | 7,84 | 7,77 | 13,44 |
| | III | 3,08 | 4,89 | 7,22 | - | - | - | - |
| 0,5 | I | 4,06 | 11,37 | 7,44 | 8,79 | 6,81 | 15,20 | 18,43 |
| | II | 3,20 | 7,12 | 8,81 | 9,12 | 10,40 | 16,88 | 18,92 |
| | III | 1,99 | 3,26 | 7,64 | - | - | - | - |
| 0,1 | I | 2,80 | 5,51 | 7,81 | 7,24 | 10,87 | 10,16 | 15,56 |
| | II | 1,18 | 4,44 | 6,25 | 8,47 | 11,10 | 17,28 | 18,82 |
| | III | 4,81 | 15,74 | 16,74 | - | - | - | - |
| 0,05 | I | 3,38 | 11,00 | 8,57 | 8,96 | 10,83 | 17,71 | 23,80 |
| | II | 4,02 | 5,74 | 6,41 | 7,68 | 15,98 | 16,82 | 19,79 |
| | III | 2,51 | 4,91 | 8,60 | 6,46 | 11,00 | 14,73 | 18,48 |

Keterangan:

Dosis 0 adalah kontrol negatif

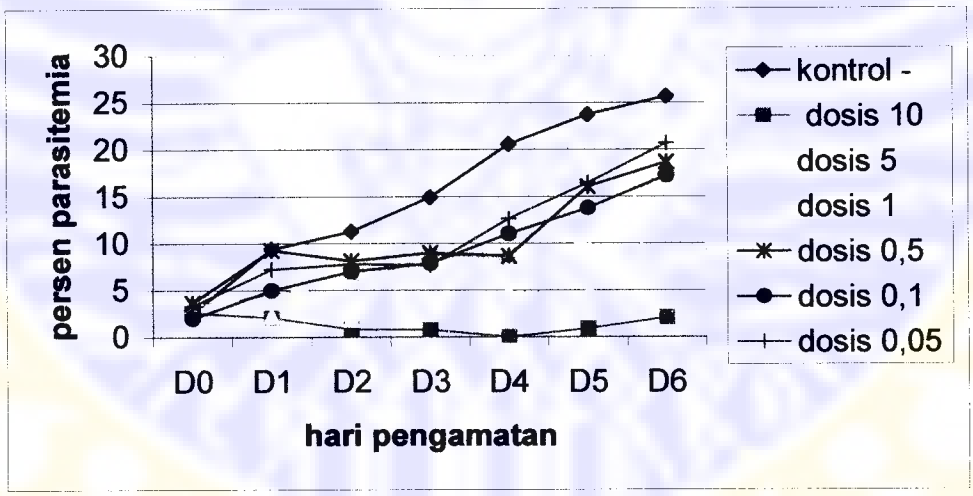
D0-D6 adalah persen parasitemia mulai hari ke-0 sampai hari ke-6

Tabel V.8 Persen parasitemia rata-rata hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif mulai D0 sampai D6

| | D0 (%) | D1 (%) | D2 (%) | D3 (%) | D4 (%) | D5 (%) | D6 (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| kontrol - | 2,52 | 9,36 | 11,25 | 14,93 | 20,6 | 23,74 | 25,71 |
| dosis 10 | 2,60 | 2,05 | 0,83 | 0,76 | 0,.64 | 0,91 | 2,05 |
| dosis 5 | 3,19 | 2,23 | 1,88 | 2,47 | 4,84 | 4,61 | 12,53 |
| dosis 1 | 3,31 | 4,62 | 5,80 | 8,68 | 8,28 | 10,18 | 18,24 |
| dosis 0,5 | 3,63 | 9,25 | 8,13 | 8,96 | 8,61 | 16,04 | 18,68 |
| dosis 0,1 | 1,99 | 4,98 | 7,03 | 7,86 | 10,99 | 13,72 | 17,19 |
| dosis 0,05 | 3,30 | 7,22 | 7,80 | 7,70 | 12,60 | 16,42 | 20,69 |

Keterangan:

D0-D6 adalah persen parasitemia rata-rata mulai hari ke-0 sampai hari ke-6




Gambar 5.5 Grafik persen parasitemia hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif mulai D0-D6

Tabel V.9 Persen pertumbuhan dan penghambatan klorokuin difosfat pada berbagai dosis

| Dosis (mg/kg BB) | | Persen pertumbuhan ( % ) | Persen pertumbuhan rata-rata ( % ) | Persen pengambatan ( % ) |
|---|---|---|---|---|
| - | I | 4,42 | 4,52 | - |
| | II | 4,63 | | |
| | III | 4,51 | | |
| 10 | I | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| | II | 0,00 | | |
| | III | 0,00 | | |
| 5 | I | 0,97 | 0,92 | 79,74 |
| | II | 0,93 | | |
| | III | 0,85 | | |
| 1 | I | 1,34 | 1,50 | 66,76 |
| | II | 1,66 | | |
| | III | - | | |
| 0,5 | I | 2,170 | 1,98 | 56,15 |
| | II | 1,80 | | |
| | III | - | | |
| 0,1 | I | 2,16 | 2,32 | 48,68 |
| | II | 2,48 | | |
| | III | - | | |
| 0,05 | I | 2,47 | 2,71 | 40,15 |
| | II | 2,99 | | |
| | III | 2,66 | | |

Keterangan:

Dosis 0 adalah kontrol negatif

Data dosis kontrol positif serta persen penghambatannya kemudian dianalisis secara probit. Diperoleh hasil $ED_{50}$ untuk klorokuin difosfat adalah 0,15667 mg/kg BB.

# BAB VI
# PEMBAHASAN

Penelitian kali ini bertujuan mengetahui aktivitas penghambatan fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* pada pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ekasari (2001) telah terbukti bahwa fraksi alkaloid hasil isolasi daun johar memiliki aktivitas sebagai antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. Pada penelitian tersebut didapatkan harga $IC_{50}$ sebesar 0,24 µg/ml yang berarti lebih efektif dibandingkan klorokuin difosfat yang memiliki $IC_{50}$ sebesar 1,03 µg/ml. Penelitian lain yang sudah dilakukan adalah tentang aktivitas antimalaria fraksi kloroform dari daun *Cassia siamea* yang dilakukan secara *in vivo*. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil $ED_{50}$ sebesar 19,58706 mg/kg BB (Kusumaningrum, 2004).

Metode ekstraksi dan isolasi yang digunakan pada penelitian kali ini mengacu pada penelitian El-Sayyed (1984). Pada penelitian tersebut El-Sahyed berhasil menemukan cara yang optimal untuk mengisolasi alkaloid golongan isokuinolon dari daun *Cassia siamea*. Alkaloid golongan isokuinolon inilah yang diduga bertanggung jawab terhadap aktivitas antimalaria dari daun *Cassia siamea*

Sebelum diekstraksi daun *Cassia siamea* yang sudah kering diserbuk terlebih dahulu. Tujuan penyerbukan atau pengecilan ukuran partikel ini adalah untuk meningkatkan luas permukaan sehingga mempercepat tercapainya keseimbangan dalam ekstraksi Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi.

Tahap ekstraksi pertama kali dimulai dengan 2301 gram serbuk daun diekstraksi dengan n-heksan. Tujuan ekstraksi ini adalah untuk menarik kandungan lemak dan senyawa bersifat non polar lainnya yang mungkin dapat mempengaruhi uji aktivitas antimalaria. Kemudian serbuk diekstraksi lagi dengan etanol 90 % yang mengandung 1 % asam tartrat, hal ini ditujukan agar alkaloid dalam bentuk basa berubah menjadi bentuk garam sehingga dapat diekstraksi dari tumbuhan dengan menggunakan pelarut polar seperti etanol. Ekstrak etanol ini kemudian dipekatkan. Selanjutnya ekstrak etanol pekat ini dibasakan dengan menggunakan $NH_4OH$ 2,5% sampai diperoleh pH 8. Penambahan $NH_4OH$

sampai pH 8 dimaksudkan untuk mendapatkan alkaloid agar dapat kembali menjadi bentuk basanya yang akan larut dalam pelarut sempolar seperti kloroform. Tahap selanjutnya adalah melakukan ekstraksi cair-cair terhadap ekstrak etanol pekat yang sudah dibasakan dengan menggunakan pelarut kloroform. Fraksi kloroform ditampung kemudian dikeringkan. Total didapat fraksi kloroform seberat 97 gram (4,216% dibanding serbuk daun awal).

Tahapan selanjutnya adalah fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum. Fraksinasi ini bertujuan untuk memperoleh fraksi-fraksi yang memiliki kandungan berbeda berdasar tingkat kepolarannya. Keuntungan dari kromatografi kolom vakum ini adalah waktu pengerjaan menjadi lebih singkat dan dapat digunakan untuk ekstrak dalam jumlah besar. Fase gerak yang digunakan untuk fraksinasi fraksi kloroform dengan kromatografi kolom vakum ada 3 macam pada berbagai perbandingan dengan polaritas yang makin meningkat, yaitu n-heksan – kloroform – etanol. Hasil dari kromatografi kolom vakum didapatkan beberapa fraksi yang mengandung alkaloid, salah satunya adalah fraksi III. Pada profil KLT tampak bahwa fraksi III relatif lebih bersih dari senyawa-senyawa yang bukan alkaloid dibanding fraksi lain. Tujuan isolasi pada penelitian kali ini adalah untuk mendapatkan fraksi yang lebih murni mengandung alkaloid, sehingga untuk tahap isolasi selanjutnya yang digunakan adalah fraksi III. Total dari 15,6 gram fraksi kloroform dihasilkan 4,0199 gram fraksi III.

Tahap selanjutnya adalah fraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka.atau kolom lambat. Secara teoritis pemisahan yang dihasilkan kolom lambat lebih baik dibanding kolom vakum, hal ini disebabkan laju eluasi yang perlahan akan memberikan waktu kontak yang lebih lama antara ekstrak, fase diam, dan fase gerak. Hasil dari fraksinasi diperoleh tiga golongan fraksi yang mengandung alkaloid yaitu fraksi A, fraksi B, dan fraksi C. Hasil dari identifikasi alkaloid pada ketiga fraksi itu didapatkan dua noda alkaloid yang masing-masing memiliki Rf sebesar 0,443 dan 0,316. Berdasarkan hasil uji orientasi fraksi alkaloid hasil isolasi yang akan diteliti aktivitas antimalarianya adalah fraksi B.

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimalaria fraksi alkaloid hasil isolasi secara *in vivo* dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* yang

diinfeksikan dalam tubuh mencit. Uji ini dilakukan secara *in vivo* dengan harapan hasil yang diperoleh nantinya akan bisa lebih menggambarkan kondisi parasit yang sesungguhnya dalam tubuh inang. Pada pengujian secara *in vivo* ada beberapa metode yang dapat dipilih diantaranya adalah metode Peter dan metode Rane. Namun yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah metode Peter. Hal ini dikarenakan dengan penggunaan metode Peter maka dapat diketahui berapa besarnya nilai $ED_{50}$, dimana dari harga $ED_{50}$ dapat digunakan sebagai salah satu parameter dalam menentukan apakah fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun Johar ini memiliki aktivitas yang cukup prospektif sebagai antimalaria.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit. Pemilihan hewan coba ini dengan mempertimbangkan beberapa aspek. Diantaranya adalah, mencit memiliki kemiripan baik itu dari segi struktur anatomi, fisiologi, metabolisme, karakteristik kesensitivan dan keresistensian pada senyawa obat dengan manusia. Disamping itu juga dipertimbangkan usia hidup mencit yang relatif singkat serta pemeliharaan yang tidak begitu rumit. Aspek ekonomis juga diperhitungkan dalam hal ini. Harga mencit sebagai hewan coba relatif lebih murah bila dibandingkan dengan hewan coba yang lainnya.

Digunakannya *Plasmodium berghei* dalam penelitian ini karena *Plasmodium berghei* merupakan parasit malaria hanya menginfeksi rhodensia serta tidak menginfeksi manusia. Selain itu *Plasmodium berghei* merupakan parasit yang paling banyak memiliki kemiripan dengan *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi manusia. Selain itu *Plasmodium berghei* memiliki kemampuan menginfeksi yang lebih cepat dan lebih ganas bila dibandingkan dengan spesies lain yang dapat menyerang hewan coba sehingga pengaruh obat terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* lebih muda teramati.

Pelaksanaan uji aktivitas antimalaria ini menggunakan fraksi B hasil isolasi daun *Cassia siamea* yang dibuat dalam bentuk suspensi pada dosis 5 mg/kg BB, 1 mg/kg BB, 0.5 mg/kg BB, 0.1 mg/kg BB, 0.05 mg/kg BB, 0.01 mg/kg BB.. Pemilihan beberapa dosis tersebut didasarkan pada hasil orientasi yang telah dilakukan sebelumnya. Karena kelarutannya dalam air cukup rendah, alkaloid hasil isolasi diberikan per oral ke mencit dalam bentuk sediaan suspensi. Hal ini untuk menjamin homogenitas dan keseragaman dosis. Sebagai bahan pensuspensi

digunakan CMC Na dengan konsentrasi sebesar 0,5 %. Selain sebagai bahan pensuspensi, larutan CMC Na 0,5% juga digunakan sebagai kontrol negatif dalam penelitian ini. Tujuan dari adanya kontrol negatif ini adalah untuk meningkatkan validitas internal dan digunakan pula sebagai pembanding dalam perhitungan besarnya penghambatan parasit oleh fraksi alkaloid hasil isolasi.

Untuk mengetahui potensi fraksi alkaloid dari daun *Cassia siamea*, maka hasilnya dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin difosfat yang selama ini dikenal sebagai standar uji aktivitas antimalaria. Sebagai parameter yang dapat dibandingkan adalah $ED_{50}$. Untuk mendapatkan $ED_{50}$ dari klorokuin difosfat, seperti halnya pada fraksi uji mesti dilakukan uji pada beberapa dosis. Dosis yang akan digunakan untuk uji kontrol positif (klorokuin difosfat) adalah 10 mg/kg BB; 5 mg/kg BB; 1 mg/kg BB; 0,5 mg/kg BB; 0,1 mg/kg BB; 0,05 mg/kg BB.

Tahap analisis data diawali dengan pengamatan persen parasitemia mulai D0 sampai D6. Setelah diperoleh persen parasitemia maka selanjutnya dilakukan perhitungan persen pertumbuhan dari D0 sampai D4. Persen pertumbuhan yang dihasilkan suspensi uji dibandingkan persen pertumbuhan kontrol negatif untuk selanjutnya digunakan untuk menghitung persen penghambatan.

Data dosis suspensi uji fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* serta persen penghambatannya masing-masing kemudian dilakukan analisis probit. Berdasar analisis probit diperoleh hasil $ED_{50}$ fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* sebesar 0,09818 mg/kg BB. Data dosis kontrol positif klorokuin difosfat serta persen penghambatannya masing-masing juga dilakukan analisis probit. Berdasar analisis probit diperoleh hasil $ED_{50}$ kontrol positif klorokuin difosfat sebesar 0,15667 mg/kg BB.

Jika dilihat dari nilai $ED_{50}$ maka fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* memiliki $ED_{50}$ yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif klorokuin difosfat. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* cukup potensial dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*.

Pengamatan terus dilanjutkan sampai D6 untuk memperoleh profil dari pertumbuhan parasit setelah pemberian suspensi uji dihentikan. Dari hasil

pengamatan menunjukkan bahwa setelah penghentian suspensi uji fraksi alkaloid maka terjadi kenaikan persen parasitemia yang cukup signifikan (D4-D6). Dari situ dapat disimpulkan bahwa efek antimalaria fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* sudah berkurang dan tidak bertahan dalam waktu lama. Ini dapat dikarenakan terjadinya proses ekskresinya yang berlangsung terlalu cepat atau, proses metabolisme menjadi bentuk tidak aktif yang juga berjalan dengan cepat.

Berbeda dengan kelompok yang diberi larutan uji dengan klorokuin difosfat. Pada kelompok ini terlihat persen parasitemia masih menunjukkan penurunan walaupun larutan uji sudah tidak diberikan lagi, bahkan sampai pada hari ketujuh pengamatan (D6). Hal ini terjadi karena klorokuin difosfat memiliki waktu paruh yang lebih panjang.

Dari data $ED_{50}$ terlihat fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* cukup potensial sebagai antimalaria. Namun berdasar profil KLTnya masih tampak adanya senyawa-senyawa lain selain alkaloid yang mungkin berpengaruh terhadap aktivitas antimalaria. Oleh karenanya perlu dilakukan suatu penelitian lebih lanjut dan perlunya dilakukan isolasi dari daun *Cassia siamea* guna memperoleh senyawa yang diinginkan yaitu alkaloid dalam jumlah yang lebih banyak dan lebih murni agar dapat diketahui aktivitas antimalarianya sebenarnya. Karena aktivitasnya yang cukup potensial sebagai antimalaria maka diharapkan fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* dapat menjadi kombinasi ataupun mengganti obat antimalaria yang sudah ada.

# BAB VII
# KESIMPULAN DAN SARAN

## 7.1 Kesimpulan

Dari penelitian uji aktivitas antimalaria dari fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit.
2. Dari hasil analisis probit diperoleh harga $ED_{50}$ dari fraksi alkaloid hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* adalah sebesar 0,09818 mg/kg BB ($\alpha$=0,05)

## 7.2 Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka perlu dilakukan suatu penelitian lebih lanjut dan perlu dilakukan isolasi dari daun *Cassia siamea* guna memperoleh senyawa yang diinginkan yaitu alkaloid dalam jumlah yang lebih banyak dan agar dapat diketahui aktivitas antimalarianya yang sebenarnya.

# DAFTAR PUSTAKA


Anonim, 2002. **Daun Johar bisa Obati Malaria**. htpp://www.gatra.com. Kamis, 26 September 2002

Anonim, 2004. **Penggunaan Artemisinin Untuk Atasi Malaria Di Daerah Yang Resisten Klorokuin**. htpp://www.depkes.go.id/index. 27 April 2004

Anonim, 2004. **Korban Malaria di Indonesia** . htpp://www.liputan6.com. 9 September 2004

Backer C. A., 1968. **Flora of Java.** Gronigen Netherland, Wolters Noordhoff N.V.

Cannell Richard J.P., 1998. **Natural product isolation**. New Jersey, Humana Press Inc

De Piro Joseph, 1997. **Pharmacoterapy ; a Pathophysiologic approach**. Third edition, US , Appleton and Lange

Depkes Republik Indonesia, 1989, *Cassia siamea* Folium, **Materia Medika Indonesia**. Jilid V, Jakarta, hal 129-133

Ekasari Wiwied, 2001. Daya Hambat Senyawa Alkaloid Daun *Cassia siamea* Pada Biakan *In vitro Plasmodium falciparum*. **Tesis**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

Gandahusada S. 1998. **Parasitologi Kedokteran**. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal 178-202

Ganiswara S. G. 2001. **Farmakologi dan Terapi**. Jakarta: Bagian Farmakologi Universitas Indonesia, hal 457

Gbeassor et al., 1989. Antimalarial Effect of Eight African Medicinal Plant. ***J. Etnopharmacology*** 25 (1): 115-118

Harborne J.B., 1987 **Metode Fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan**,. Edisi ke 2, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwan Soediro. Bandung, Penerbit ITB

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga



Heyne K, 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia**. Jilid III, Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Departemen Kehutanan, Jakarta, hal 926-927

Kusumaningrum D, 2004. Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kloroform Daun Johar (*Cassia siamea*) Terhadap *Plasmodium berghei* Secara *In vivo*. **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya

Leiden University Medical Center, 2002. ***The Plasmodium berghei* Research Model of Malaria**. htpp://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model01.html. last update 19-07-2002

Masroerah dan Sutaryo B.,1994. Tumbuhan sebagai sumber Obat Antimalaria. **Bulletin ISFI Jatim** Volume 22 nomor 1 1994. Surabaya

Mursito Bambang, 2002. **Ramuan Tradisional untuk Penyakit Malaria**, Jakarta, Penebar Swadaya

Philipson, J. D., 1991. Assays for Antimalarial and Amoebicidal Activities. In : Day P. M, and Harborne J. B (Ed.), 1991. **Methods in plant Biochemistry**. Vol 6. Academic Press London, hal 135-152

Ross SA, Sayed SM, 1986. New Isoquinolin Alkaloid From The Leaves of Cassia siamea Lamk, **Journal of Natural Product**. Vol 47(4), hal 708-710

Siswandono dan Soekarjo B. 2000. **Kimia Medisinal**. Ed 2. Surabaya: Airlangga University Press, hal 84-86

Skoog Douglas Arvid, 1985. **Principles of Instrumental Analysis**. Third edition, United States, CBS College

Steenis J, G., 1997. **Flora Untuk Sekolah Di Indonesia**. Cetakan ke-7, Jakarta: Paramita Pradnya PT, hal 216

Sutisna P. 2003. **Malaria Secara Ringkas dari Pengetahuan Dasar Sampai Terapan**. Bali: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Tetty, 2003. **Ramuan Tradisional untuk mengatasi aneka penyakit**. Jakarta, Redaksi Agromedia.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga



Touchstone Joseph C. Dobbins Murrel F., 1983. **Practice Thin Layer Chromatography**, United States, John and Willey Sons Inc

Zulkarnain I. 1987. **Ilmu Penyakit Dalam**, Jilid I Edisi ke-2, Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia, Balai Penerbit FKUI. Hal 75-79

Lampiran 1

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA BOGOR
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA PURWODADI
PASURUAN - JAWA TIMUR

KOTAK POS NO. 104 LAWANG 65201

TELP. /FAX. (0341) 426046
E-MAIL : kriplip@malang.wasantara.net.id

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI
No. [illegible]/IPH.UPT.03/HM/2004

[illegible] Kebun Raya Purwodadi dengan [illegible] menerangkan bahwa mahasiswa [illegible]

Widiyanto Kurniawan / NIM 050112365

Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya di Surabaya [illegible] UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal [illegible] Juni 2004 berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer Vol I (1963) hal 541, nama ilmiahnya adalah

| | |
|---|---|
| Marga | *Cassia* |
| Jenis | *Cassia siamea* Lmk |

Adapun menurut buku The Standard Cyclopedia of Horticulture karangan L.H. Bailey (jld I (1953) halaman 3, klasifikasinya adalah sebagai berikut

| | |
|---|---|
| Divisio | Spermatophyta |
| Sub Divisio | Angiospermae |
| Kelas | Dicotyledoneae |
| Ordo / Bangsa | Rosales |
| Family / Suku | Fabaceae |

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

An. Kepala
UPT Balai Konservasi Tumbuhan
Kebun Raya Purwodadi
Unit Jasa & Informasi

M. SOLKHAN, S.Hut.
NIP.320004506

## Lampiran 2

Pembuatan larutan etanol 90% yang mengandung asam tartrat 1%

Misalkan dibuat 100 ml larutan:

1. Ditimbang asam tartrat seberat $\frac{1}{100}$ x 100 gram = 1 gram
2. Diambil etanol 96% sebanyak $\frac{90}{96}$ x 100 ml = 93,75 ml
3. Asam tartrat dilarutkan ke dalam etanol.
4. Selanjutnya ditambah aquades ad 100 ml

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga



## Lampiran 3

Pembuatan Medium Alceiver

Misalkan dibuat 100 ml larutan

- Gliserin 9,5 ml
- Dextrose 2,33 gram
- NaCl 0,52 gram
- Tri Sodium Sitrat 1,00 gram
- Aqua bidestilata ad 100 ml

## Lampiran 4

Persen Parasitemia

Untuk menghitung persen parasitemia digunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{jumlah eritrosit yang terinfeksi}}{\text{jumlah eritrosit total}} \times 100\ \%$$

Misalnya:

Contoh:

- jika jumlah eritrosit yang terinfeksi = 100
- jika jumlah eritrosit total = 5000
- Maka % parasitemia : $\frac{100}{5000} \times 100\% = 2\%$

**Lampiran 5**

Persen Pertumbuhan

Untuk mencari harga % pertumbuhan digunakan rumus :

$$\% \text{ pertumbuhan} = \frac{P(D2-D1)+P(D3-D2)+P(D4-D3)+....+P(D7-D6)}{n}$$

P (dx-dx-1) = % pertumbuhan hari x dikurangi % parasitemia hari sebelumnya

Apabila terjadi penurunan % parasitemia antara sebuah hari dan hari sesudahnya maka pertumbuhan dianggap 0.

Contoh perhitungan sebagai berikut :

Data % parasitemia dosis 100 mg/kg BB hari ke1 sampai hari ke 4 adalah :

Replikasi 1 : 6.25, 7.66, 8.45, 9.36, 9.99

Replikasi 2 : 4.15, 6.25, 8.84, 9.95, 10.25

Replikasi 3 : 5.85, 6.47, 7.32, 9.21, 11.25

% pertumbuhan replikasi 1 :

$$\frac{(7.66-6.25)+(8.45-7.66)+(9.36-8.45)+(9.99-9.36)}{4}=0.825$$

% pertumbuhan replikasi 2 :

$$\frac{(6.25-4.15)+(8.84-6.25)+(9.95-8.84)+(10.25-9.95)}{4}=1.525$$

% pertumbuhan replikasi 3 :

$$\frac{(6.47-5.85)+(7.32-6.47)+(9.21-7.32)+(11.25-9.21)}{4}=1.35$$

% pertumbuhan rata-rata : $\frac{0.825+1.525+1.35}{3}=1.233$

**Lampiran 6**

Persen Penghambatan

Untuk mencari harga % penghambatan digunakan rumus :

| % penghambatan = 100% - [Xe/Xk x 100%] |
|---|

Keterangan : Xe = % pertumbuhan rata-rata parasit pada tiap dosis bahan uji

Xk = % pertumbuhan parasit pada kontrol negatif

Contoh perhitungannya sebagai berikut :

% pertumbuhan rata-rata dosis 100 mg/kg BB sebesar 0.15%

% pertumbuhan rata-rata kontrol negatif sebesar 2.50%

maka % penghambatan dosis 100 mg/kg BB adalah :

$$100\% - \left[\frac{0.15}{2.50} x 100\%\right] = 94\%$$

Contoh perhitungan lain :

% pertumbuhan rata-rata dosis 50 mg/kg BB sebesar 0.60%

% pertumbuhan rata-rata kontrol negatif sebesar 2.50%

maka % penghambatan dosis 50 mg/kg BB adalah :

$$100\% - \left[\frac{0.60}{2.50} x 100\%\right] = 76\%$$

**Lampiran 7**

Hasil Uji Orientasi

| | Terdiri dari fraksi nomor | Dosis (mg/kg BB) | Persen Penghambatan (%) | ED50 (mg/kg BB) |
|---|---|---|---|---|
| Fraksi A | 107, 108, 109 | 3,0 | 59,93 | 0,915 |
| | | 0,3 | 36,62 | |
| | | 0,03 | 30,33 | |
| Fraksi B | 110, 111, 112, 113, 114 | 3,0 | 67,61 | 0,153 |
| | | 0,3 | 58,20 | |
| | | 0,03 | 34,58 | |
| Fraksi C | 115, 116, 117, 118, 119 | 3,0 | 54,90 | 1,672 |
| | | 0,3 | 42,34 | |
| | | 0,03 | 38,66 | |

# Lampiran 8

Hasil Analisis Probit Fraksi Alkaloid

* * * * * * * * * * * * * P R O B I T  A N A L Y S I S * * * * * * *

Observed and Expected Frequencies

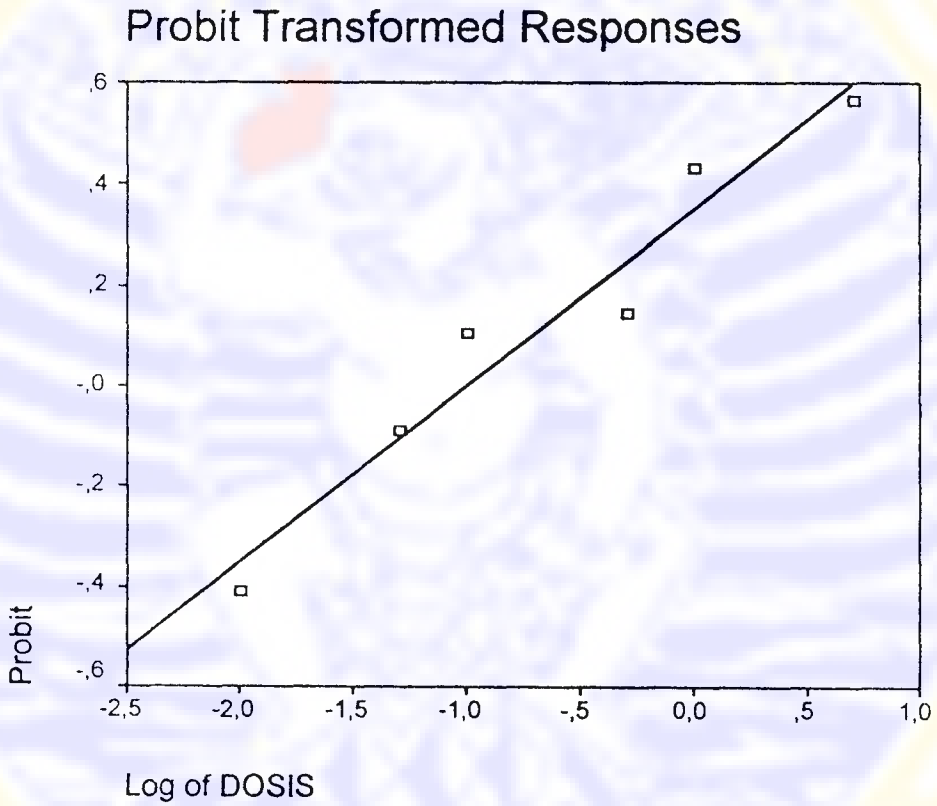
| DOSIS | Number of Subjects | Observed Responses | Expected Responses | Residual | Prob |
|---|---|---|---|---|---|
| -2,00 | 100,0 | 34,1 | 36,349 | -2,219 | ,36349 |
| -1,30 | 100,0 | 46,4 | 45,893 | ,537 | ,45893 |
| -1,00 | 100,0 | 54,2 | 50,112 | 4,088 | ,50112 |
| -,30 | 100,0 | 55,9 | 59,824 | -3,974 | ,59824 |
| ,00 | 100,0 | 66,8 | 63,861 | 2,919 | ,63861 |
| ,70 | 100,0 | 71,3 | 72,599 | -1,269 | ,72599 |

* * * * * * * * * * * * * P R O B I T  A N A L Y S I S * * * * * * *

Confidence Limits for Effective DOSIS

| Prob | DOSIS | 95% Confidence Limits Lower | Upper |
|---|---|---|---|
| ,01 | ,00000 | 7,942969E-12 | ,00000 |
| ,02 | ,00000 | 1,144446E-10 | ,00001 |
| ,03 | ,00000 | 6,214141E-10 | ,00001 |
| ,04 | ,00000 | 2,217794E-09 | ,00002 |
| ,05 | ,00000 | 6,240310E-09 | ,00004 |
| ,06 | ,00000 | ,00000 | ,00006 |
| ,07 | ,00001 | ,00000 | ,00009 |
| ,08 | ,00001 | ,00000 | ,00013 |
| ,09 | ,00002 | ,00000 | ,00018 |
| ,10 | ,00002 | ,00000 | ,00024 |
| ,15 | ,00011 | ,00000 | ,00080 |
| ,20 | ,00040 | ,00002 | ,00212 |
| ,25 | ,00119 | ,00008 | ,00492 |
| ,30 | ,00318 | ,00034 | ,01057 |
| ,35 | ,00789 | ,00126 | ,02171 |
| ,40 | ,01871 | ,00437 | ,04382 |
| ,45 | ,04315 | ,01400 | ,08942 |
| ,50 | ,09818 | ,04145 | ,19195 |
| ,55 | ,22340 | ,11051 | ,45747 |
| ,60 | ,51511 | ,26271 | 1,25971 |
| ,65 | 1,22149 | ,57811 | 3,99126 |
| ,70 | 3,03441 | 1,24419 | 14,35576 |
| ,75 | 8,10102 | 2,74199 | 59,29192 |
| ,80 | 24,17850 | 6,46264 | 294,24485 |
| ,85 | 86,49106 | 17,28611 | 1933,62626 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ,90 | 429,98496 | 58,87777 | 20919,47824 |
| ,91 | 633,39524 | 79,05902 | 37229,88050 |
| ,92 | 964,77189 | 108,84978 | 69667,70544 |
| ,93 | 1532,38497 | 154,64785 | 138819,12260 |
| ,94 | 2569,15323 | 228,81468 | 299950,01872 |
| ,95 | 4631,74476 | 357,53142 | 722564,66968 |
| ,96 | 9256,74596 | 603,66299 | 2031050,07147 |
| ,97 | 21684,41175 | 1148,56259 | 7241277,75877 |
| ,98 | 67233,41343 | 2698,43001 | 39276507,6406 |
| ,99 | 400084,30151 | 10353,50250 | 565204473,173 |



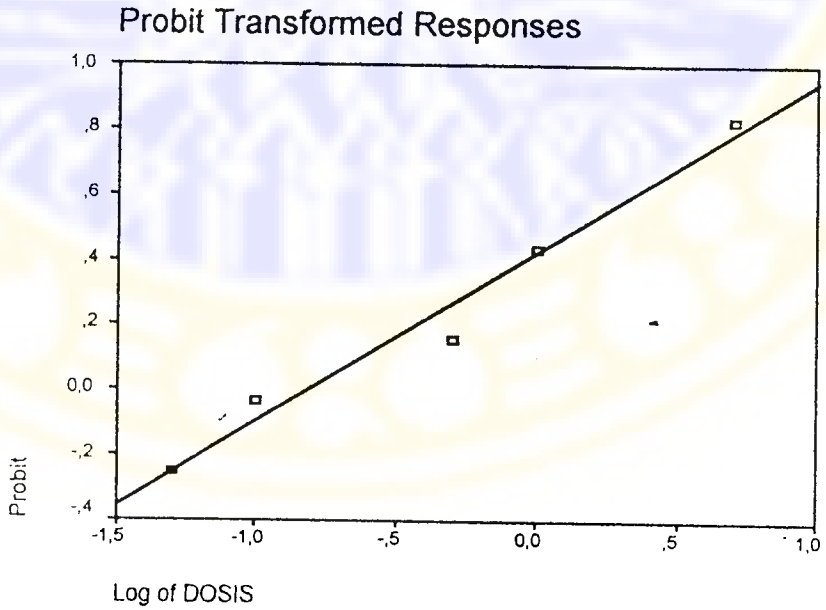
# Lampiran 9

Hasil Analisis Probit Klorokuin Difosfat

```
* * * * * * * * * * * * P R O B I T   A N A L Y S I S * * * * *
* *

 Parameter estimates converged after 11 iterations.
 Optimal solution found.

 Parameter Estimates (PROBIT model:  (PROBIT(p)) = Intercept +
BX):

            Regression Coeff.  Standard Error     Coeff./S.E.

   DOSIS            ,71469          ,07255          9,85111


                   Intercept  Standard Error  Intercept/S.E.

                   ,57535          ,06086          9,45430

  Pearson  Goodness-of-Fit  Chi Square =  19,400    DF = 4    P =
,001

  Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity
  factor is used in the calculation of confidence limits.

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
- - -

* * * * * * * * * * * * P R O B I T   A N A L Y S I S * * * * *
* *

 Observed and Expected Frequencies
```

| DOSIS | Number of Subjects | Observed Responses | Expected Responses | Residual | Prob |
|---|---|---|---|---|---|
| -1,30 | 100,0 | 40,2 | 36,148 | 4,002 | ,36148 |
| -1,00 | 100,0 | 48,7 | 44,459 | 4,221 | ,44459 |
| -,30 | 100,0 | 56,2 | 64,065 | -7,915 | ,64065 |
| ,00 | 100,0 | 66,8 | 71,747 | -4,987 | ,71747 |
| ,70 | 100,0 | 79,7 | 85,879 | -6,139 | ,85879 |
| 1,00 | 100,0 | 100,0 | 90,148 | 9,852 | ,90148 |

```
 * * * * * * * * * * * * P R O B I T   A N A L Y S I
S  * * * * * * *
 Confidence Limits for Effective DOSIS
```

| Prob | DOSIS | 95% Confidence Limits Lower | Upper |
|---|---|---|---|
| ,01 | ,00009 | 5,974494E-11 | ,00263 |
| ,02 | ,00021 | 5,974787E-10 | ,00458 |
| ,03 | ,00037 | 2,571099E-09 | ,00653 |
| ,04 | ,00056 | 7,699378E-09 | ,00853 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ,05 | ,00078 | ,00000 | ,01060 |
| ,06 | ,00105 | ,00000 | ,01277 |
| ,07 | ,00135 | ,00000 | ,01504 |
| ,08 | ,00169 | ,00000 | ,01742 |
| ,09 | ,00208 | ,00000 | ,01993 |
| ,10 | ,00252 | ,00000 | ,02256 |
| ,15 | ,00556 | ,00000 | ,03789 |
| ,20 | ,01041 | ,00002 | ,05772 |
| ,25 | ,01783 | ,00006 | ,08357 |
| ,30 | ,02892 | ,00021 | ,11779 |
| ,35 | ,04527 | ,00066 | ,16409 |
| ,40 | ,06926 | ,00188 | ,22886 |
| ,45 | ,10451 | ,00506 | ,32392 |
| ,50 | ,15667 | ,01292 | ,47351 |
| ,55 | ,23486 | ,03113 | ,73323 |
| ,60 | ,35437 | ,06981 | 1,24679 |
| ,65 | ,54215 | ,14283 | 2,43025 |
| ,70 | ,84863 | ,26504 | 5,62695 |
| ,75 | 1,37633 | ,45523 | 15,79706 |
| ,80 | 2,35816 | ,75239 | 55,10218 |
| ,85 | 4,41728 | 1,25352 | 254,85137 |
| ,90 | 9,73025 | 2,24360 | 1858,98244 |
| ,91 | 11,77501 | 2,56676 | 3022,28612 |
| ,92 | 14,48615 | 2,96519 | 5133,86479 |
| ,93 | 18,19297 | 3,46831 | 9210,89932 |
| ,94 | 23,46475 | 4,12341 | 17729,67846 |
| ,95 | 31,36577 | 5,01192 | 37497,84531 |
| ,96 | 44,10996 | 6,28798 | 90627,51019 |
| ,97 | 67,07846 | 8,28604 | 268960,09240 |
| ,98 | 117,10678 | 11,91150 | 1146512,88531 |
| ,99 | 281,83987 | 20,96860 | 11341630,7812 |