

SKRIPSI

SISKA PERMANA SARI

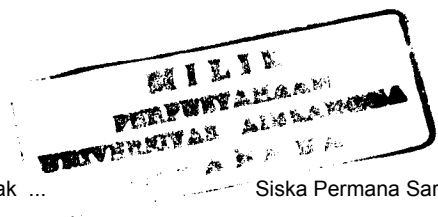
**AKTIVITAS ANTIMALARIA FRAKSI DARI
EKSTRAK METANOL KULIT BATANG CEMPEDAK
(ARTOCARPUS CHAMPEDEN SPRENG.) TERHADAP
PLASMODIUM BERGHEI IN VIVO**



FF 1741/08

Sar
a

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2007**



Lembar Pengesahan

AKTIVITAS ANTIMALARIA FRAKSI DARI EKSTRAK METANOL KULIT BATANG CEMPEDAK (*ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG.) TERHADAP *PLASMODIUM BERGHEI* IN VIVO

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2007

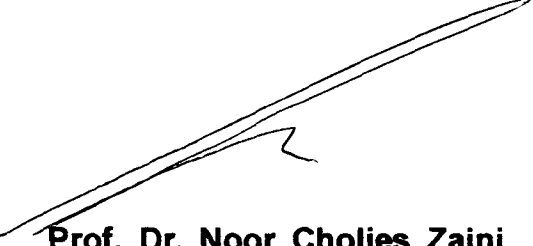
Oleh :

SISKA PERMANA SARI
NIM : 050312732

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta


Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130355372


Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi.
NIP. 131877884

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah Yang Maha Kuasa, atas berkat dan rahmat-Nya dalam segala hal yang kami kerjakan, khususnya pada penyelesaian skripsi ini, dengan selalu menuntun kami.

Dengan terselasaikannya skripsi dengan judul "**Aktivitas Antimalaria Fraksi Ekstrak Metanol Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden Spreng.*) terhadap *Plasmodium berghei In Vivo***" maka pada kesempatan yang baik ini, penulis hendak menyampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Dr., Noor Cholies Zaini selaku dosen pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan petunjuk, bimbingan serta dorongan sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Aty Widyawaruyanti., MSi selaku dosen pembimbing serta yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan petunjuk, bimbingan serta dorongan sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Dr. Indah S. Tantular M. Kes. dan Dr. Achmad Fuad Hafid, MS, Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan dukungan, saran dan kritik.
4. Drs. Mulya Hadi Santosa selaku dosen wali, atas dorongan dan bimbingan akademik yang diberikan.
5. Ayahanda Hadi Siswanto tercinta dan Ibunda Sari Hikmah tercinta, serta adikku yang selalu memberikan semangat dan do`a selama menempuh pendidikan sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
6. *Special Thanks to Dini Retnowati* yang telah meluangkan waktu dan rumahnya untuk membantu penyelesaian skripsi ini hingga titik terakhir.
7. Kepala dan staf karyawan Lab. Botani – Farmakognosi, Lab. Fitokimia dan Lab. Hewan atas bantuan selama pengerjaan penelitian.
8. Kepala dan staf karyawan Tropical Disease Center atas bantuan selama mengerjakan penelitian.
9. Rekan – rekan satu laboratorium pada penelitian ini antara lain : Cempedak Klub ("Bude" Dian, "Pipi" Dyah, mbak Wahyu dan Bu Maria), Sambiloto Klub (*Single Fighter* Dini), Bidara Laut klub (duet Yuyun dan Iin), Johar klub

(Esti, Eta, Ima, Rima, Eko, Aan, Gugus, Maisya, Irma), Ayis, Polish, Monita, Ega, Astri, Grace dan lainnya yang telah memberikan bantuan dan dorongan semangat.

10. Teman-teman angkatan 2003, khususnya Reguler Genap yang sudah berbagi suka dan duka selama 4 tahun, dan banyak memberi semangat, nasehat serta persahabatan yang tidak terlupakan.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan, kritik dan saran sampai terselesaikannya penelitian dan skripsi ini.

Semoga Allah S. W. T. senantiasa melimpahkan rahmat- Nya atas budi baik yang telah diberikan.

Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi yang masih jauh dari sempurna ini dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang farmasi dan dapat bermanfaat bagi masyarakat, serta mendorong pihak lain untuk menyempurnakan penelitian ini.

Surabaya, Agustus 2007

Penyusun,

Siska Permana Sari

Ringkasan

AKTIVITAS ANTIMALARIA FRAKSI DARI EKSTRAK METANOL KULIT BATANG CEMPEDAK (*ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG.) TERHADAP *PLASMODIUM BERGHEI* IN VIVO

Siska Permana Sari

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit utama didunia, termasuk Indonesia. Namun, upaya pemberantasan yang telah dilakukan belum berhasil karena resistensi parasit malaria terhadap sejumlah obat malaria. Oleh karena itu, dilakukan pengembangan obat antimalaria baru dari tanaman yang telah terbukti secara empiris dapat digunakan sebagai terapi alternatif untuk malaria.

Cempedak (*A. champeden* Spreng.) yang termasuk dalam familia Moraceae terbukti secara empiris mampu mengobati malaria. Dari penelitian sebelumnya, ekstrak metanol kulit batang cempedak terbukti secara ilmiah mempunyai aktivitas antimalaria *in vivo* dan *in vitro*. Ekstrak metanol mengandung senyawa aktif (flavonoid) yang telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Untuk lebih mengetahui senyawa yang berperan pada antimalaria dilakukan pemisahan lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa tersebut.

Dalam penelitian ini digunakan mencit Balb/C jantan dan diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. Bahan uji yang digunakan adalah fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.). Fraksi didapat dari fraksinasi menggunakan metode VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*). Dari hasil fraksinasi tersebut diperoleh lima fraksi utama (F I M – F V M). Setelah dilakukan pengujian antimalaria pada dosis 10 mg/kg BB didapatkan hasil bahwa fraksi metanol (F II M) mempunyai aktivitas antimalaria yang paling poten. Fraksi (F II M) kemudian dibuat larutan uji dengan dosis 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 mg/kg BB mencit. Larutan uji ini diberikan secara *intraperitoneal*. Sebagai kontrol positif adalah klorokuin difosfat dan sebagai kontrol negatif adalah DMSO. Masing-masing larutan uji ini diberikan sekali sehari secara *intraperitoneal* selama 4 hari berturut-turut (D₀ – D₃).

Hasil uji diamati dengan cara membuat preparat hapusan darah tipis dari ekor mencit sejak pemberian larutan uji yang dimulai pada hari ke-0 sampai dengan hari ke-6 (D₀ – D₆) dengan pewarnaan Giemsa pada gelas obyek dan dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit per-5000 eritrosit dengan mikroskop perbesaran 1000 kali. Kemudian dihitung persentase pertumbuhan parasit dan persentase penghambatan dari masing-masing replikasi fraksi uji. ED₅₀ dihitung dari data hari ke-0 sampai dengan hari ke-4. Sedangkan pengamatan pada hari ke-5 dan hari ke-6 untuk melihat profil pertumbuhan parasit.

Hasil penelitian dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-4 ($D_0 - D_4$) menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) pada dosis 0,001 mg/kg BB mencit, 0,01 mg/kg BB mencit, 0,1 mg/kg BB mencit, 1 mg/kg mencit dan 10 mg/kg BB mencit, menunjukkan persen penghambatan terhadap *P. berghei* masing-masing sebesar 39,86 %; 46,56 %; 56,47 %; 68,04 %; dan 74,38 %. Sedangkan pada hari ke-5 dan hari ke-6 terjadi peningkatan pertumbuhan parasit pada mencit coba setelah pemberian larutan uji dihentikan. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) dalam darah tidak cukup untuk membunuh seluruh parasit.

Berdasarkan hasil prosen penghambatan rata-rata, dilakukan analisis data dengan menggunakan analisis probit dan diperoleh ED_{50} sebesar 0,02 mg/kg BB mencit. Penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) memiliki potensi antimalaria terhadap *P. berghei in vivo* pada mencit dan prospektif dikembangkan sebagai obat antimalaria.

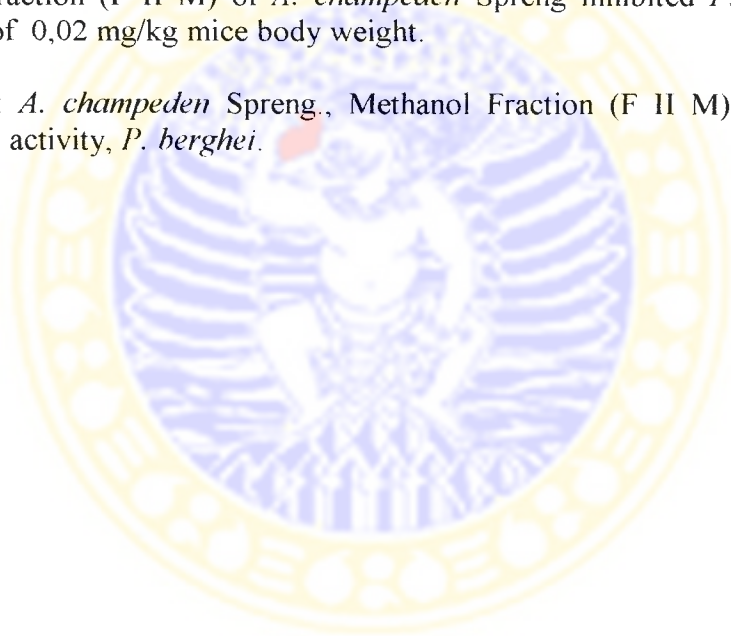


Abstract

Antimalarial Effect Methanolic Fraction (F II M) of *Artocarpus champeden* Spreng. Stem Bark at Growth *Plasmodium berghei* In Vivo

The stem bark of *Artocarpus champeden* Spreng was empirically used as antimalarial drug in Indonesia. Methanolic fraction of *A. champeden* Spreng. stem bark was used to study the antimalarial effect *in vivo* in male BALB/c mice infected with *P. berghei*, based on Peter's test (The 4-day suppressive test blood schizontocidal action). The Methanolic fraction (F II M) was diluted with DMSO to 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 mg/kg body weight of mice. The serial dilution of methanolic fraction (F II M) were administered intraperitoneally daily when parasitemia reached 1 – 5 %. Each dose was administered daily from initial day after infection for four days by intraperitoneal route. The result showed that Methanol Fraction (F II M) of *A. champeden* Spreng inhibited *P. berghei* with ED₅₀ value of 0,02 mg/kg mice body weight.

Keywords : *A. champeden* Spreng., Methanol Fraction (F II M), antimalarial activity, *P. berghei*.



DAFTAR ISI

	HALAMAN
Halaman judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Kata pengantar	iii
Ringkasan	v
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan tentang <i>Artocarpus champeden</i> Spreng.	5
2.1.1. Klasifikasi Tanaman	5
2.1.2. Nama Daerah	5
2.1.3. Deskripsi Tanaman	6
2.1.4. Kandungan Kimia	6
2.1.5. Bioaktivitas dan Kegunaan Tanaman	7
2.2. Tinjauan tentang Malaria	7
2.3. Tinjauan tentang <i>Plasmodium berghei</i>	8
2.3.1. Klasifikasi <i>Plasmodium berghei</i>	8
2.3.2. Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	8
2.3.3. Siklus hidup <i>Plasmodium berghei</i>	8

2.3.4. Pembiakan <i>In Vivo Plasmodium berghei</i>	12
2.4. Klasifikasi Obat Antimalaria	13
2.5. Tinjauan tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman dengan metode <i>In Vivo</i>	14
2.5.1. Tes Peter	14
2.5.2. Tes Rane	14
2.6. Tinjauan tentang Ekstraksi	15
2.7. Tinjauan tentang Fraksinasi dan Kromatografi Kolom Vakum	16
2.8. Beberapa Senyawa dari Tanaman yang bersifat Antimalaria	17
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL	18
3.1. Landasan Teori	18
3.2. Skema Kerangka Konseptual	20
BAB IV. METODE PENELITIAN	21
4.1. Bahan Penelitian	21
4.1.1. Bahan Tanaman	21
4.1.2. Parasit Uji	21
4.1.3. Hewan coba	21
4.1.4. Bahan Pembanding	21
4.1.5. Bahan lain untuk Uji Antimalaria secara <i>In Vivo</i>	21
4.1.6. Pelarut	22
4.2. Alat-alat yang digunakan	22
4.2.1. Alat untuk Ekstraksi	22
4.2.2. Alat untuk Fraksinasi	22
4.2.3. Alat untuk Uji Antimalaria secara <i>In Vivo</i>	22
4.3. Metode Penelitian	23
4.3.1. Pembuatan Ekstrak Metanol	23
4.3.2. Pembuatan Fraksi Metanol	24
4.3.3. Skrining Fitokimia Fraksi Metanol	25
4.3.4. Penginfeksian <i>P. berghei</i> dan Perhitungan % Parasitemia	26
1. Pembiakan pada mencit donor	26
2. Pembuatan Preparat Hapusan Darah Tepi	26
3. Perhitungan Parasitemia	27

4.3.5. Penentuan Potensi Fraksi Aktif (orientasi)	27
1. Pengelompokan mencit	27
2. Pengujian Antimalaria Fraksi dari Ekstrak Metanol terhadap <i>P.berghei</i>	27
4.3.6. Penentuan ED ₅₀	28
1. Penyiapan Bahan Uji	28
2. Penyiapan Larutan Kontrol Negatif	29
3. Teknik Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vivo</i>	29
4. Pengamatan Aktivitas	30
5. Analisis Data	30
BAB V. HASIL PENELITIAN dan ANALISIS DATA	33
5.1. Pembuatan Ekstrak Metanol <i>A. champeden</i> Spreng	33
5.2. Pembuatan Fraksi Metanol <i>A. champeden</i> Spreng.	34
5.3. Identifikasi Fraksi Metanol	35
5.4. Uji Pendahuluan Aktivitas Antimalaria	36
5.5. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M)	39
5.6. Analisa Data Fraksi Metanol (F II M)	44
BAB VI. PEMBAHASAN	45
BAB VII. KESIMPULAN dan SARAN	49
DAFTAR PUSTAKA	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1. Hasil penimbangan Fraksi Metanol Kulit Batang <i>A. champeden</i>	34
5.2. Persen Parasitemia pada uji Pendahuluan Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M – F V M) dan Kontrol Negatif	37
5.3. Hasil Perhitungan Persen Pertumbuhan dan Persen Penghambatan Parasit dari Fraksi Metanol (F II M – F V M) dan Kontrol Negatif	38
5.4. Persen Parasitemia pada uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M) dan Kontrol Negatif	40
5.5. Persen Parasitemia Rata-rata dari <i>P. berghei</i> pada Pemberian Fraksi Metanol (F II M) dan Kontrol Negatif	41
5.6. Hasil Perhitungan Persen Pertumbuhan dan Persen Penghambatan Parasit dari Fraksi Metanol (F II M) dan Kontrol Negatif	43
5.7. Harga ED ₅₀ dari Fraksi Metanol (F II M) dan Klorokuin Difosfat ...	44

DAFTAR GAMBAR

2.1.	Cempedak (<i>Artocarpus champeden</i> Spreng)	5
4.1.	Skema pembuatan ekstrak metanol dari kulit batang cempedak (<i>Artocarpus champeden</i> Spreng.)	22
4.2.	Skema penyiapan parasit uji fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (<i>Artocarpus champeden</i> Spreng.) terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei in vivo</i>	31
4.3.	Skema rancangan penelitian dan uji aktivitas antimalaria fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (<i>Artocarpus champeden</i> Spreng.) terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei in vivo</i>	32
5.1.	Kromatogram Hasil Identifikasi Fraksi Metanol Kulit Batang <i>A. champeden</i> Spreng.	35
5.2.	Kromatogram Hasil Identifikasi Fraksi Metanol Kulit Batang <i>A. champeden</i> Spreng. pada UV 365 nm	35
5.3.	Grafik Hubungan Persen Parasitemia dengan Hari Pemberian Fraksi Metanol (F II M) terhadap Prosen Pertumbuhan Parasitemia	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi	53
Lampiran 2. Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	54
Lampiran 3. Pembuatan Larutan Bahan Uji	55
Lampiran 4. Persen Parasitemia	56
Lampiran 5. Rata-rata Pertumbuhan Parasit	59
Lampiran 6. Prosen Penghambatan	61
Lampiran 7. Hasil Analisis Probit Fraksi Metanol (F II M) Kulit Batang <i>A. champeden</i> Spreng.	62



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Malaria merupakan salah satu penyakit endemis didaerah tropis maupun subtropis, seperti Asia, Afrika, Amerika Tengah dan Amerika Selatan, Oseania dan pulau Karibia. Majunya sarana perhubungan dapat memudahkan terjadinya penyebaran malaria dari daerah endemis ke daerah lain. Penyakit infeksi ini ditimbulkan oleh parasit dari genus *Plasmodium*, yaitu : *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium malariae*. Walaupun malaria bukan merupakan penyakit yang menyebabkan banyak kematian, namun gejala yang ditimbulkan oleh penyakit ini dapat menyebabkan produktivitas manusia menjadi menurun. (WHO, 2006)

Gejala malaria muncul rata-rata 9 sampai 14 hari setelah terinfeksi. Gejalanya ditandai dengan badan terasa tidak enak, sering demam hingga suhu tubuh mencapai 40 °C, sakit kepala, muntah (*vomiting*) dan gejala-gejala lain yang mirip dengan gejala flu. Jika tidak segera diobati atau parasit sudah resisten terhadap obat antimalaria yang diberikan, maka infeksi akan berkembang cepat dan berakibat fatal yaitu kematian. Hal ini disebabkan karena adanya perusakan sel darah merah (*anemia*), penyumbatan pembuluh darah kapiler yang membawa darah ke otak (*Cerebral Malaria*), atau gangguan fungsi organ tubuh lainnya. (Utomo, 2003)

Pada 1950, penyakit malaria telah teratasi dengan adanya obat sintetik yang relatif murah seperti klorokuin dan primakuin, serta dilakukan pemberantasan nyamuk (yang merupakan *hospes* dari malaria) dengan menggunakan DDT dan insektisida lain. Pada 1956, WHO mencanangkan program pemberantasan malaria. Pada 1966, program tersebut dinyatakan sukses dan beberapa ratus juta masyarakat yang pernah terjangkit malaria sembuh tanpa adanya resiko terjadinya infeksi. Namun, dengan berlalunya waktu, keadaan tersebut menjadi lebih parah karena resistensi *Plasmodium* terhadap obat yang digunakan dan resistensi nyamuk *Anopheles* terhadap insektisida. Sekarang, beberapa negara di Asia Tenggara dan Amerika Selatan mengalami peningkatan jumlah penderita malaria

dan sebagian besar dikarenakan resistensi strain *P. falciparum* terhadap klorokuin. (Phillipson, 1991)

Penyebaran *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin meningkatkan kebutuhan untuk mengembangkan obat antimalaria baru. Pada banyak negara tropis dan subtropis, berbagai tanaman telah digunakan secara tradisional untuk mengobati malaria. Dua tanaman telah menghasilkan obat antimalaria yang efektifitasnya tinggi melawan *P. falciparum*, yaitu kulit kayu kina yang menghasilkan kuinin dan kuinidin, serta *Artemisin annua* yang diisolasi menjadi artemisinin. (Bickii, 2000)

Indonesia merupakan salah satu negara tropis dengan jumlah penduduk yang sangat banyak serta kelembaban tinggi, sehingga dapat memicu timbulnya penyakit infeksi malaria. Tetapi, Indonesia juga mempunyai berbagai macam tanaman yang dapat berkhasiat untuk menjaga kesehatan, sehingga bangsa Indonesia dapat memanfaatkan alam untuk pemeliharaan dan pengobatan penyakit. Kekayaan hayati yang sudah dimanfaatkan nenek moyang sejak dulu sampai kini masih memiliki potensi untuk lebih dikembangkan. Disamping obat-obatan medis, beberapa tanaman juga dikenal dapat membantu penderita malaria melawan penyakitnya. Beberapa tanaman masih belum terbukti mampu mematikan bibit penyakit malaria. Namun, secara empiris sudah terbukti mampu meningkatkan daya tahan tubuh penderitanya. (Wahjoedi, 2002)

Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) yang termasuk dalam familia Moraceae, mayoritas tumbuh di beberapa kawasan Asia Tenggara termasuk Indonesia, telah dimanfaatkan sebagai sebagai bahan pangan, bahan bangunan, dan bahan ramuan obat tradisional salah satunya sebagai antimalaria. Menurut Hakim (1998), cempedak mengandung tiga senyawa fenolik yaitu siklocampedol, artokarpin, dan heteroflavanon A, serta lima senyawa non-fenolik yaitu glutinol, sikloartenon, 24-metilensikloartenon dan β -sitosterol. Beberapa diantaranya telah diketahui memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro*. Sejauh ini, telah diketahui adanya aktivitas antimalaria dari uji *in vitro* pada tumbuhan marga *Artocarpus* yang lain seperti *Artocarpus integer* yang telah terbukti mempunyai aktivitas untuk menghambat pertumbuhan parasit malaria (IC_{50}) = 8,2 μ g/ml. (Boonlaksiri, 1999)

Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden*) mempunyai aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *P. berghei* dengan nilai ED₅₀ 6,95 mg/kg BB (Utomo, 2003). Ekstrak metanol yang digunakan diperoleh dari 1 tahapan pelarutan (setelah dimaserasi dengan metanol) dan diberikan secara per-oral. Sedangkan, Widyawaruyanti (2004) melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit batang cempedak mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *P. berghei* secara *in vivo* dengan nilai ED₅₀ 0,48 mg/kg BB. Ekstrak metanol yang digunakan diperoleh dari 3 tahapan pelarutan (setelah dimaserasi dengan n-Heksana, diklorometana, dan metanol) dan diberikan secara per-oral.

Ernawati (2005) melaporkan bahwa fraksi metanol (F5M) kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) memiliki aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *P. berghei* dengan nilai ED₅₀ 0,01 mg/kg BB. Fraksi metanol (F5M) diberikan secara *intraperitoneal*. Sedangkan, Markus (2006) melaporkan bahwa fraksi metanol (F2M) cempedak memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* secara *in vitro* dengan nilai IC₅₀ 4,23 µg/ml. Fraksi metanol diperoleh dari proses fraksinasi menggunakan kromatografi kolom terbuka. Cempedak (*A. champeden*) yang digunakan berasal dari propinsi Irian Jaya.

Adanya perbedaan tanaman yang digunakan serta perbedaan proses fraksinasi, dapat menyebabkan perbedaan komposisi dan kandungan dari tiap fraksi yang dihasilkan. Untuk itu, pada penelitian kali ini dilakukan uji aktivitas antimalaria kulit batang cempedak yang berasal dari Bogor. Setelah dilakukan ekstraksi dan fraksinasi (menggunakan metode *Vaccum Liquid Chromatography* (VLC)), diperoleh fraksi yang akan diamati daya hambatnya terhadap *Plasmodium berghei* dalam kultur *in vivo* pada mencit.

Dalam penelitian ini, digunakan metode *in vivo* untuk uji aktivitas antimalaria karena pelaksanaannya (menggunakan rodensia sebagai hewan coba) relatif lebih mudah dilakukan dan lebih sederhana. Metode *in vivo* juga lebih mewakili terhadap adanya proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi pada senyawa uji sekaligus memberikan gambaran interaksi antara inang dengan parasit. *P. berghei* adalah salah satu dari spesies *Plasmodium sp.* yang menyerang mamalia selain manusia. Parasit ini dapat digunakan sebagai model uji aktivitas

antimalaria karena memiliki kemiripan dengan spesies parasit malaria yang menjangkiti manusia ditinjau dari segi struktur, fisiologis dan siklus hidup (Carter dan Diggs, 1977).

1.2 Perumusan Masalah

Apakah fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng) mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *P. berghei in vivo*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui aktivitas antimalaria fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng) terhadap *P. berghei in vivo*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Menentukan harga ED₅₀ fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) yang dianggap paling aktif terhadap *P. berghei in vivo*.

1.4 Hipotesis

Fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng) mempunyai aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *P. berghei*.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Menemukan tanaman yang dapat mempunyai potensi sebagai terapi alternatif terhadap penyakit malaria.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang potensi aktivitas antimalaria dari tanaman yang berguna bagi pengembangan lebih lanjut obat tradisional untuk antimalaria.
3. Mendapatkan obat antimalaria baru yang potensial dari tanaman dan sebagai dasar dalam pengembangan produksi obat antimalaria antara lain sebagai obat fitofarmaka.

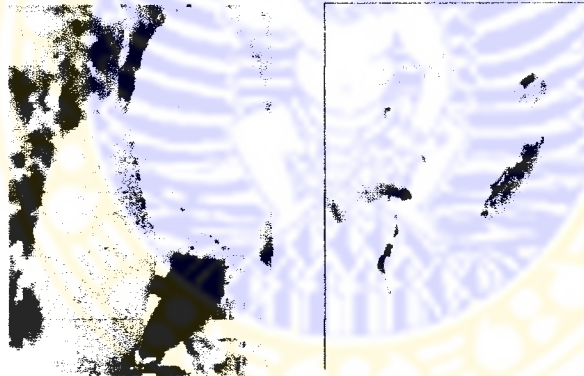
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Artocarpus champeden* Spreng.

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub Kelas	: Monochlamydae
Bangsa	: Urticales
Suku	: Moraceae
Marga	: <i>Artocarpus</i>
Jenis	: <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. (Van Steenis, 1978; Backer & Van den Brink, 1965)
Sinonim	: <i>Artocarpus polyphema</i> Pers. (Heyne, 1987)



Gambar 2.1 Buah Cempedak dan kulit batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng)

2.1.2 Nama Daerah

Pada beberapa daerah, *Artocarpus champeden* Spreng. dikenal dengan berbagai nama, antara lain :

- Sunda : Campedak, cempedak, nangka beurit.
- Jawa : Campedak, cepedak, cempedak, nangka cina
- Madura : Nangka comedak, comedak, cempedak (Van Steenis, 1978 ; Backer & Van den Brink, 1965)
- Irian Jaya : Cempedak

2.1.3 Deskripsi Tanaman

- Habitus** : Pohon berumah satu, tinggi 10 – 20 meter, berbuah pada bulan Juli hingga September, ditanam atau tumbuh secara liar pada ketinggian 20 - 650 m.
- Batang** : Membulat dengan banyak getah yang rekat.
- Daun** : Helai daun tipis sampai memanjang atau bulat telur terbalik 10 – 25 x 5 – 10 cm dengan tangkai 1 – 3 cm, terdapat banyak trikoma pada bagian tulang daun, pangkal pendek yang menyempit, tepi rata, serupa kulit, dari atas mengkilat, hijau tua. Daun pemumu bulat telur memanjang.
- Bunga** : Karangan bunga jantan atau betina. Bulir betina berbentuk gada memanjang; bunga tenggelam dalam poros, bagian yang bebas panjangnya ± 3 mm, pada ujung berpori muncul kepala putik yang tunggal berbentuk solet, yang seperti cacing. Bulir jantan silindris, hijau pucat atau kekuningan; bunga sangat kecil, dengan tenda bunga pendek bertaju dua, yang pipih dan satu benang sari.
- Buah** : Buah semu, sering pada cabang, silindris memanjang, bau menusuk, bertonjolan ringan; tonjolan piramidal segi 4 -7; daging sekeliling biji, seperti terdapat semacam lapisan berlendir.
- Biji** : Biji panjangnya 2 – 3 cm, dilingkupi oleh semacam lapisan daging biji berwarna kuning tua, lembut, tipis mengandung banyak air dan terasa manis. (Van Steenis, 1978 ; Morton, 1987)

2.1.4 Kandungan Kimia

Hakim (1998) melaporkan adanya senyawa flavonoid yang diberi nama siklocampedol yang terdapat pada kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.), bersama dengan empat senyawa triterpen antara lain sikloekalenol, glutinol, sikloartenon, dan 2,4-metilen sikloartenon serta bentuk sterol yaitu β -sitosterol. Selain itu, jaringan kayu dan kulit batang *Artocarpus champeden* Spreng. masing masing mengandung senyawa flavonoid diantaranya artokarpin dan heteroflavon-A.

2.1.5 Bioaktivitas dan Kegunaan Tanaman

Cempedak (*A. champeden* Spreng.) merupakan salah satu tanaman pangan yang dikonsumsi pada beberapa daerah di Indonesia, kayunya yang keras dan awet dapat dipakai untuk bahan bangunan (Heyne, 1997). Buah dan bijinya dapat dimakan sedangkan bagian tanaman lainnya dimanfaatkan sebagai bahan ramuan obat tradisional misalnya pada pengobatan demam, disentri, malaria, dan penyakit kulit. Selain itu, diketahui bahwa senyawa *artokarpin* dan *siklocampedol* dari ekstrak kulit batang cempedak memberikan derajat toksisitas yang cukup tinggi terhadap *Artemia salina* pada uji *brain shrimp* sehingga diduga memiliki aktivitas anti tumor (Hakim, 1998).

2.2 Tinjauan tentang Malaria

Malaria merupakan wabah endemik yang dapat terjangkit pada daerah tropis, daerah iklim panas dan basah. Daerah tersebut antara lain Amerika Tengah dan Selatan, Kepulauan Karibia, Afrika, Asia Selatan, Asia Timur, Asia Tenggara, dan Oseania.

Malaria termasuk penyakit infeksi dengan demam berkala yang disebabkan oleh parasit bersel tunggal yaitu protozoa yang termasuk genus *Plasmodium* dan ditularkan oleh sejenis nyamuk *Anopheles*. Berdasarkan spesies penyebabnya, penyakit malaria dibedakan menjadi 4 macam, yaitu :

1. Malaria falciparum (malaria tertiana maligna, malaria tropika)

Disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. Merupakan parasit paling berbahaya karena penyakit yang ditimbulkan dapat menjadi berat dan dapat mengakibatkan kematian dalam beberapa hari. Parasit malaria ini terdapat di daerah dengan iklim panas dan lembab.

2. Malaria malariae (malaria kuartana)

Disebabkan oleh *Plasmodium malariae*. Disebut malaria kuartana karena serangan demam berulang pada tiap hari keempat. Parasit malaria ini menjangkiti daerah tropis saja.

3. Malaria vivax (malaria tertiana benigna)

Disebabkan oleh *Plasmodium vivax*. Parasit malaria ini menjangkiti daerah tropis, sub tropis dan daerah yang memiliki 4 musim.

4. Malaria ovale

Disebabkan oleh *Plasmodium ovale*. Malaria ovale merupakan jenis yang paling ringan dan dapat sembuh sendiri tanpa pengobatan (Gandahusahada, 1998)

Penyakit malaria yang disebabkan karena infeksi *Plasmodium falciparum* yang berat mempunyai gejala kejang, koma, hemoglobinuria, edema paru akut, gagal ginjal akut, pendarahan, gangguan pembekuan darah, asidosis metabolik, hipoglikemi, aspirasi *pneumonia* dan hiperparasitemia. (Zulkarnain, 1994)

2.3 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei*

2.3.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

Filum	: Protozoa
Sub Filum	: Sporozoa
Kelas	: Telosporea
Sub Kelas	: Coccidea
Suku	: Plasmodiidae
Marga	: <i>Plasmodium</i>
Jenis	: <i>Plasmodium berghei</i>

2.3.2 Morfologi *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei sebagai parasit penyebab malaria pada rodensia (hewan pengerat) mempunyai beberapa bentuk parasit dalam darah, yaitu bentuk ring (cincin), trophozoit, skizon, dan gametosit.

1. Bentuk ring (cincin)

Tampak seperti cincin dengan sitoplasma berwarna biru dengan nukleus (inti sel) kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan Giemsa dari hapusan darah tepi.

2. Bentuk trophozoit

Bentuk berupa amoeboid, nukleus berwarna merah, sitoplasma berwarna biru, dan dengan pembelahan nukleus, stadium skizon terjadi.

3. Bentuk skizon

Ukuran kira kira 27 μm pada hari ke empat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas (*maurer dot*), kemungkinan diakibatkan karena rusaknya sitoplasma karena populasi parasit mencapai $\frac{2}{3}$ bagian eritrosit.

4. Bentuk gametosit

Ada 2 macam bentuk yaitu makrogametosit dan mikrogametosit. Makrogametosit berbentuk oval dengan noda biru yang mengandung kumpulan nukleus dan granula. Mikrogametosit bentuknya seperti renal atau kacang dengan noda biru lemah atau kemerahan mengandung nukleus yang mengkilat serta granula kecil dan tersebar.

2.3.3 Siklus hidup *Plasmodium berghei*

Siklus hidup *Plasmodium berghei* terdiri dari 2 fase yaitu fase aseksual (skizogoni) dan siklus seksual (sporogoni). Manusia merupakan tempat berlangsungnya fase aseksual (sekali sebagai *hospes* (inang) sementara). Sedangkan, tempat berlangsung fase seksual atau tahap reproduksi yang diikuti oleh sporogoni adalah pada nyamuk *Anopheles durenii* betina yang memegang peranan ganda yaitu vektor dan *hospes* definitif.

1. Siklus seksual

Infeksi malaria terjadi dengan masuknya sporozoit melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi parasit.

❖ Fase praeritrosit atau eksoeritrosit

Setelah memasuki aliran darah, sporozoit *Plasmodium berghei* akan terikut menuju hepar dan menyerang sel hepatosit (sama seperti *Plasmodium* lainnya yang menyerang manusia). Proses invasi ini diperantarai oleh *invaginasi* membran plasma hepatosit membentuk rongga (vakuola) yang akan ditempati sporozoit (berlangsung mulai hitungan menit hingga hitungan jam setelah inokulasi). Sporozoit mengalami mobilisasi dari sel yang satu ke sel lainnya sebelum menyerang hepatosit dengan mekanisme pembentukan vakuola. Di

dalam hepatosit, sporozoit berkembang menjadi trophozoit sampai menjadi skizon hati dewasa dalam waktu 47 – 52 jam, tiap skizon mengandung terdapat 1500 – 8000 merozoit berinti tunggal. Pembelahan untuk menjadi merozoit dimulai 24 jam setelah sporozoit memasuki sel hati dan dalam 26 jam setelahnya terjadi setidaknya 13 kali pembelahan. Pola dasar dari pembentukan merozoit sama dengan yang terjadi pada skizon eritrosit dan pembelahan sporogoni pada nyamuk. Setelah sel hati pecah, merozoit akan terlepas ke sirkulasi sistemik dan menyerang eritrosit.

❖ Fase eritrosit, terdiri dari :

a. Perkembangan aseksual

Merupakan tahap perkembangan lebih lanjut dari fase seksual. Ditandai dengan invasi merozoit pada eritrosit. *Plasmodium berghei* cenderung menyerang retikulosit atau eritrosit dewasa. Di dalam eritrosit, merozoit berkembang menjadi trophozoit yang ditandai dengan peningkatan ukuran sel dan sitoplasma. Trophozoit menggunakan hemoglobin untuk metabolisme dan menghasilkan hemozoin (pigmen kecoklatan yang tersebar di sitoplasma yang menjadi penanda khas fase ini) sebagai hasil metabolisme.

Perkembangan merozoit menjadi trophozoit dewasa memerlukan waktu sekitar 16 jam. Setelah fase trophozoit selesai, terjadi replikasi DNA parasit diikuti dengan pembelahan inti sehingga menghasilkan parasit berinti ganda (skizon). Pada proses skizogoni yang memakan waktu 6 – 8 jam, parasit mengalami pembelahan inti berkali kali membentuk sel yang berinti 8 – 24. Setelah tahap skizogoni selesai, parasit akan membentuk merozoit yang memerlukan waktu 22 – 24 jam. Skizon dalam retikulosit mengandung lebih banyak merozoit daripada yang ada dalam eritrosit dewasa. Skizon dewasa dan skizon muda akan menghilang dari sirkulasi darah tepi dan terakumulasi pada pembuluh kapiler organ viseral seperti paru paru, limpa, hepar dan otak (tingkatan akumulasi dan letak akumulasi pada organ berbeda tergantung strain *Plasmodium berghei*). Setelah skizon pecah, merozoit akan menyerang eritrosit baru dan menyebabkan peningkatan parasitemia.

b. Perkembangan seksual

Pada siklus seksual, sejumlah kecil parasit berhenti membelah secara aseksual dan berdeferensiasi menjadi bentuk seksualnya yang disebut gametosit. Ada 2 jenis gametosit yaitu makrogametosit (betina) dan mikrogametosit (jantan). Sekitar 5 – 25% parasit *Plasmodium berghei* (bentuk merozoit dari skizon hati setelah terjadi invasi pada eritrosit) mengalami diferensiasi seksual secara langsung selama 26 – 30 jam.

Diperlukan waktu sekitar 18 – 22 jam untuk mengetahui bahwa sudah terjadi bentuk gametosit yang dapat diamati ciri cirinya seperti inti sel tunggal yang besar, distribusi granul pigmen pada sitoplasma, dan ukuran sel. Setelah 24 jam dapat diketahui adanya mikro gametosit yang ditandai dengan inti lebih besar, granul dan badan osmiofilik lebih sedikit daripada makro gametosit.

2. Siklus seksual

❖ Fertilisasi dan perkembangan zigot pada nyamuk

Hanya gametosit dewasa yang dapat berkembang dalam abdomen nyamuk setelah terjadi penghisapan darah oleh nyamuk terhadap *hospes* terinfeksi. Perkembangan selanjutnya, gametosit berubah menjadi gamet dan makrogametosit berubah menjadi 1 makrogamet sedangkan mikrogametosit berubah menjadi 8 mikrogamet dengan morfologi seperti sperma.

Fertilisasi dimulai dengan penetrasi mikrogamet kedalam makrogamet menghasilkan zigot diploid ($2n$) antara 10 menit sampai 1 jam setelah terbentuknya gamet, kemudian fertilisasi dan fusi inti antara kedua gamet dan dilanjutkan dengan pembelahan meiosis. Pembelahan meiosis tidak langsung diikuti pembelahan inti, tetapi didahului pembentukan zigot berinti (ookinet) dengan DNA haploid (n) 2 sampai 4 kali lebih banyak.

❖ Ookista dan perkembangan sporozoit

Ookinet dewasa yang aktif dapat menembus epitel lambung dan tinggal diantara membran sel paling inferior dan *basal lamina* dinding lambung. Pada tahap ini, ookinet berubah menjadi ookista dan mengalami replikasi mitosis

sampai terdapat ribuan sporozoit. Ookista mengalami pembesaran diameter dari 2 – 4 μm menjadi 40 μm dalam 10 – 12 hari. Jumlah ookista dan sporozoit berbeda untuk tiap spesies nyamuk *Anopheles*. Ookista kemudian pecah dan sporozoit lepas memasuki kelenjar ludah. Sporozoit kemudian bermigrasi keluar dari kelenjar ludah dan memasuki ruang sekretori ekstraseluler dimana akan menetap disana sampai diinjeksikan ke inang baru. Dari setiap gigitan nyamuk hanya 20 – 50 sporozoit yang masuk kedalam tubuh inang. (LUMC, 2002)

2.3.4 Pemiakan *In Vivo Plasmodium berghei*

Rodensia yang sering digunakan dalam penelitian seperti mencit, tikus, hamster, kelinci umumnya sensitif terhadap infeksi *Plasmodium berghei* baik lewat gigitan nyamuk maupun injeksi peritoneal dari darah yang telah terinfeksi parasit. Pada strain rodensia yang berbeda mempunyai perbedaan tingkat kepekaan terhadap infeksi yang cukup besar sehingga mempengaruhi pada strain nyamuk yang digunakan untuk menginfeksi. Sporozoit dapat ditemukan dalam hepatosit dalam hitungan menit hingga jam setelah inokulasi, untuk laju pembelahan aseksual dalam darah untuk *Plasmodium berghei* berdasarkan penelitian relatif stabil (10 kali pembelahan per 24 jam saat fase I siklus eritositik).

Penginfeksian secara buatan dilakukan secara *intravena* atau *intrapitoneal* dengan meng-injeksikan eritrosit yang mengandung bentukan fase aseksual eritrositiknya (cincin, trophozoit, dan skizon). Prosedur rutin yang banyak digunakan adalah dengan mengambil darah dari ekor hewan yang terinfeksi dengan parasitemia lebih dari 20 % dan menyuntikkan 200 μl pada hewan coba secara *intrapitoneal*. Berdasarkan pengalaman, sekitar 10 % dari parasit yang disuntikkan berhasil hidup dan memasuki sirkulasi darah. Dengan laju pembelahan *Plasmodium berghei* (strain ANKA) pada mencit yang berkisar 10 kali tiap 24 jam dalam fase pertama siklus eritrositiknya, maka dapat diperkirakan parasitemia yang didapatkan dengan penginfeksian dosis eritrosit terinfeksi yang berbeda. (LUMC, 2002)

2.4 Klasifikasi Obat Antimalaria

Berdasarkan mekanisme kerja dibagi menjadi 6 golongan yaitu :

1. Skizontosida jaringan (skizontosida eritrositik) yang merupakan pencegahan kausal.

Mekanisme kerjanya dengan destruksi jaringan primer plasmodia dan merozoit di hepar, yang dimulai dari tahap infeksi eritrositik, lalu mencegah invasi eritrositik dan lain lain penyebaran infeksi ke nyamuk *Anopheles*. Contoh : klorguanid, pirimetamin dan primakuin.

2. Skizontosida jaringan, yang digunakan pada upaya preventif kekambuhan. Mekanisme kerjanya berlangsung pada bentuk skizon di jaringan laten, jaringan sekunder, atau hipnozoit dari *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* di hepatosit. Contoh : primakuin dan pirimetamin.

3. Skizontosida darah (skizontosida eritrositik), yang digunakan untuk pengobatan klinik dan supresif.

Mekanisme kerja berlangsung pada merozoit pada fase eritrositik aseksual dari parasit malaria dan mengganggu skizogoni eritrositik.

4. Gametosida

Mekanisme kerjanya dengan destruksi bentuk eritrosit seksual (gametosit) dari parasit malaria sehingga mencegah penyebaran plasmodia ke dalam tubuh nyamuk *Anopheles*.

5. Sporozoitosida

Mekanisme kerjanya dengan membunuh sporozoit setelah masuk dalam darah setelah gigitan nyamuk. Duration of action sangat singkat karena sporozoit segera ke sel hepar sehingga banyak obat anti malaria kurang aktif terhadap bentuk sporozoit tersebut.

6. Sporontosida

Mekanisme kerjanya melalui pencegahan pembentukan oosit dan sporozoit dalam tubuh nyamuk malaria yang menginfeksi hospes. Contoh : klorguanid, pirimetamin dan primakuin. (Siswandono dan Bambang Soekardjo, 2000)

2.5 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman dengan metode *In Vivo*

Pada umumnya dilakukan 2 tes untuk pengujian aktivitas antimalaria dengan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* yang biasanya digunakan untuk dasar skrining ekstrak tanaman, yaitu dengan tes Peter dan tes Rane.

2.5.1 Tes Peter (the 4 – day suppressive test of blood schizontocidal action)

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat lebih kurang 20 gram ditempatkan dalam ruang yang bersuhu sekitar $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$ sebanyak 5 kelompok dan diberi nutrisi dengan menu standar. Darah dari mencit donor dengan parasitemia yang sudah tinggi (sekitar 20 % eritrosit yang terinfeksi) dilarutkan dalam medium kultur sampai tiap 0,2 ml mengandung 10^7 eritrosit yang terinfeksi. Tiap mencit diberi 0,2 ml secara intravena pada hari ke 0. Ekstrak tanaman dapat dilarutkan atau dibuat suspensi dengan triturasi atau sonifikasi setelah penambahan 0,2 % larutan Tween atau 0,5 % larutan CMC atau 0,5 % larutan DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan setiap hari dengan rentang dosis 1 – 100 mg/kg BB mencit , dimulai sejak hari dimulainya penginfeksian selama 4 hari berturut turut lewat secara per oral atau subkutan. Pada hari ke 5, diambil sampel darah dari ekor dan dilakukan pewarnaan dengan pewarna yang sesuai (misal Giemsa). Kemudian, diukur persentase jumlah eritrosit yang terinfeksi dibandingkan total eritrosit yang diamati. Harga ED_{50} (dalam kasus ini menunjukkan adanya penekanan atau penghambatan parasit sebanyak 50 % populasi). Dapat dihitung dengan log dosis vs aktivitas probit.

2.5.2 Tes Rane

Dasar dari tes ini adalah perbandingan efek dari perlakuan standar pemberian *Plasmodium berghei* yang membunuh mencit dalam 6 hari dengan perpanjangan waktu bertahan 12 hari, dengan perlakuan pemberian sebuah dosis tunggal ekstrak yang diuji coba. Kelompok kontrol diberikan 10^6 sel donor yang terinfeksi secara *intrapertoneal* pada hari ke-1 dan larutan ekstrak tanaman atau suspensi dalam oleum *Arachidis* yang telah disonifikasi melalui rute subkutan dengan interval dosis 640 , 320 , 160 dan 80 mg/kg BB mencit pada hari ke-4.

Penilaian aktivitas berdasarkan jumlah yang masih hidup, lebih dari 2 x lipat dibandingkan kelompok kontrol. Minimum Effective Dose (MED) yang didapat dibandingkan Maximum Tolerated Dose (MTD) yang mengakibatkan tak lebih dari 1/5 jumlah mencit mati karena efek toksik. Dosis yang lebih rendah diperlukan untuk memperoleh harga MED. Tes dapat digunakan untuk mengetahui profil obat karena menyertakan ukuran perbandingan antara efikasi dengan toksisitasnya.

Kedua tes tersebut tidak berlaku untuk pengujian untuk senyawa dengan masa kerja yang lama dan bila diperlukan maka dapat dilakukan uji dengan *Plasmodium yoelli* atau *Plasmodium vinckei* pada mencit. Tes malaria pada rodensia juga diperlukan untuk pengujian senyawa dengan aktivitas anti malaria yang bersifat skizontosida dan gametosida jaringan.

2.6 Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan secara fisika maupun kimia untuk memisahkan zat padat maupun cair dari bentuk padat. Pada proses ini, tanaman atau simplisia diekstraksi dengan pelarut tertentu, sehingga sel-sel tanaman mengembang, permeabilitasnya meningkat atau sel pecah. Beberapa parameter yang mempengaruhi proses ekstraksi antara lain :

1. Pengembangan sel tanaman (*swelling of the drug*).
2. Difusi, pH, ukuran partikel, dan temperatur.
3. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi.

Prosedur ekstraksi ada beberapa macam, antara lain : maserasi, perkolasi dan *countercurrent extraction*. Maserasi merupakan proses ekstraksi yang paling sederhana dan bisa digunakan untuk skala kecil maupun skala industri. Maserasi dilakukan dengan menuang sejumlah solven ke dalam wadah yang berisi simplisia, kemudian dibiarkan selama beberapa saat (\pm 24 jam), kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak. Proses ini biasa digunakan untuk mendapatkan tingtur, ekstrak dan merupakan satu-satunya metode yang dapat digunakan pada tanaman atau simplisia yang mengandung banyak musilago.

Pada perkolasi, simplisia diekstraksi hingga mencapai titik jenuh dengan pelarut baru terus-menerus. Proses ini lebih panjang dan lebih mahal. Untuk menghemat jumlah pelarut, dapat digunakan lebih dari satu perkolator dan menggunakan perkolat untuk perkolator baru. Konsep ini dinamakan reperkolasi. Metode ini mengarah pada *countercurrent extraction*, dimana simplisia segar diekstraksi dengan solven yang telah mengandung sejumlah solut dan solven yang baru digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang telah sebagian terekstraksi.

2.7 Tinjauan tentang Fraksinasi dan Kromatografi Kolom Vakum

Fraksinasi adalah proses pemisahan dari suatu campuran menjadi beberapa fraksi. Tipe atau metode fraksinasi tergantung dari sampel dan tujuan pemisahan. Pada umumnya, kolom dieluasi dengan eluen tertentu sehingga menghasilkan beberapa fraksi dan diikuti dengan analisis fraksi untuk menentukan fraksi yang mengandung senyawa (*compound*) yang diinginkan. Mengelompokkan hasil fraksinasi dalam banyak fraksi kecil memungkinkan tiap fraksi mengandung senyawa yang murni, namun dibutuhkan waktu lebih lama untuk menganalisa tiap fraksi. Ada juga kemungkinan senyawa target justru tersebar dalam banyak fraksi, sehingga bila berada dalam konsentrasi yang kecil akan sulit terdeteksi.

Salah satu alternatif dalam pengerjaan fraksinasi adalah dengan kromatografi kolom cepat dengan menggunakan vakum pada outlet kolom. Penggunaan vakum pada umumnya adalah untuk purifikasi cepat senyawa yang diinginkan. Misalnya, bila telah diketahui bahwa senyawa tertentu dari ekstrak dapat dieluasi dari adsorben dengan kondisi tertentu, maka dapat digunakan corong *scinterred glass* yang diisi oleh adsorben. Ekstrak ditambahkan pada adsorben tersebut dan dieluasi secara langsung dengan fase gerak. Metode ini yang dikenal dengan Kromatografi Kolom Vakum (*Vacuum Liquid Chromatography*). (Cannell, 1998)

2.8 Beberapa Senyawa dari Tanaman yang bersifat Antimalaria

Umumnya aktivitas anti malaria dikandung dalam tanaman yang punya metabolit sekunder dari golongan tertentu yaitu triterpenoid, alkaloid, dan antrakuinon. Beberapa dari metabolit sekunder tersebut yang telah teruji sebagai anti malaria diantaranya :

❖ Golongan Alkaloid

- Kuinin, kinkonin, kinkonidin dari *Cinchona sp.*
- Berberin dari familia Berberidaceae, Annonaceae, dan Menispermaceae. (Tyler, Bracy, Robbers, 1988)
- Protoberberin dari *Enantian clorantha*
- Febrifugin dari *Diochorea febrifuga*
- Alstonin dari *Alstonia constricta* (Wiryowidagdo, 2000)
- Siaminin dari *Cassia siamea* (dengan inti isokuinolin)
- Usambarensin dari *Strychnos usambarensis* (Phillipson, 1991)

❖ Golongan Terpenoid

- Artemisinin dari *Artemisia annua*. (Wiryowidagdo, 2000)
- Brucein dan turunannya dari *Brucea sp.*
- Nimbolid dari *Azadirachta indica*.
- Sergeloid dari *Picrolemma pseudocoffea*.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Landasan Teori

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit utama didunia, termasuk Indonesia. Namun, upaya pemberantasan yang telah dilakukan belum berhasil karena resistensi parasit malaria terhadap sejumlah obat malaria. Oleh karena itu, dilakukan pengembangan obat antimalaria baru dari tanaman yang telah terbukti secara empiris dapat digunakan sebagai terapi alternatif untuk malaria. (WHO, 2006)

Cempedak (*A. champeden* Spreng.) yang termasuk dalam familia Moraceae, mayoritas tumbuh di beberapa kawasan Asia Tenggara termasuk Indonesia, telah dimanfaatkan sebagai bahan pangan, bahan bangunan dan ramuan bahan obat tradisional salah satunya sebagai antimalaria (Hakim, 1998). Utomo (2003) melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit batang cempedak mempunyai aktivitas antimalaria pada mencit yang terinfeksi *P. berghei* dengan nilai ED_{50} 6,95 mg/kg BB. Sedangkan, Widyawaruyanti (2004) melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit batang cempedak yang diperoleh dari tiga tahapan pelarutan (setelah dimaserasi dengan n-Heksana, diklorometana dan metanol) dan diberikan secara per-oral, memiliki ED_{50} sebesar 0,48 mg/kg BB.

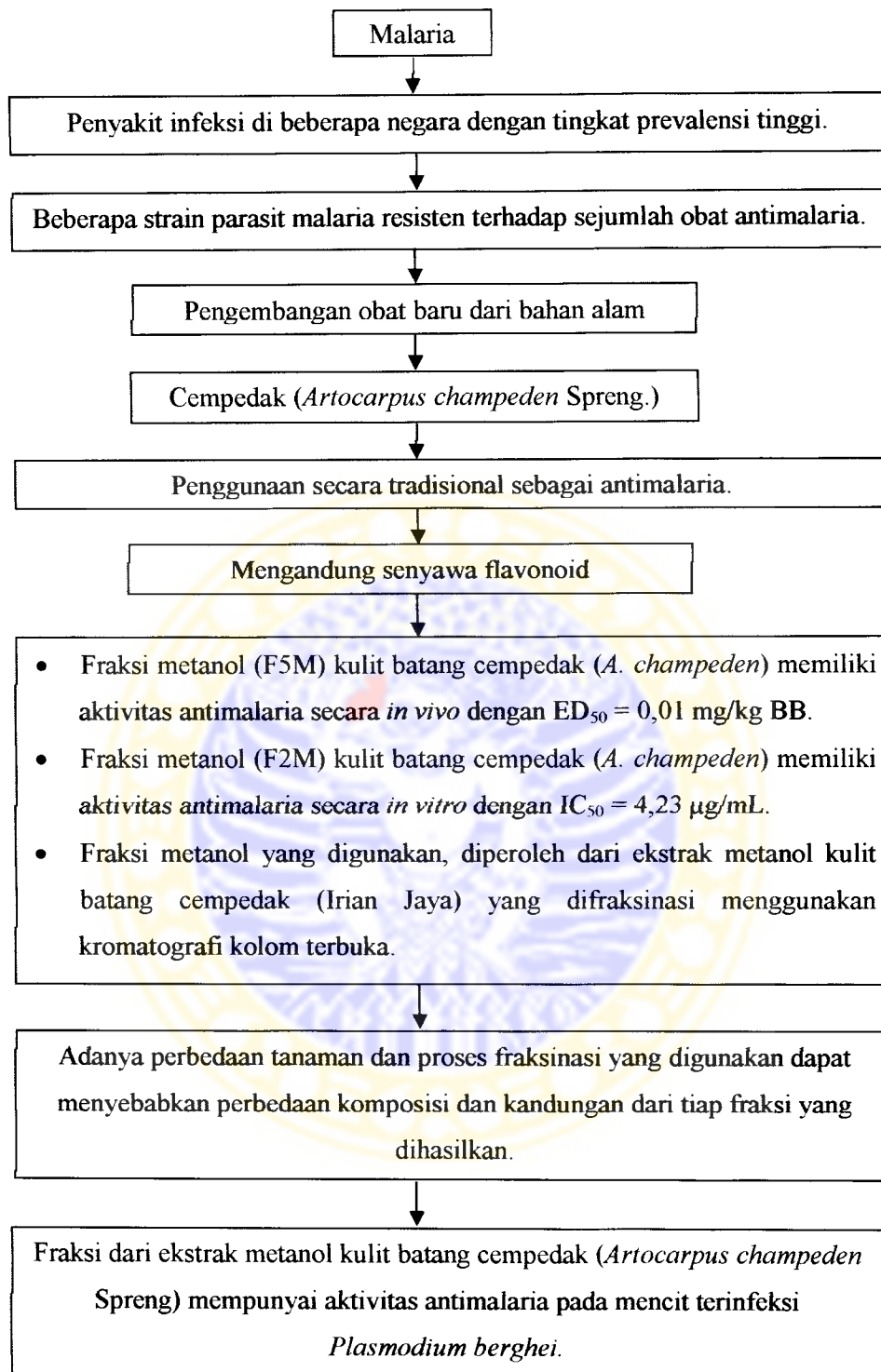
Penelitian terhadap fraksi metanol (F5M) kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) secara *in vivo*, menunjukkan aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *P. berghei* dengan nilai $ED_{50} = 6,95$ mg/ kg BB. Penelitian terhadap fraksi metanol (F2M) kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) terhadap *P. falciparum* secara *in vitro*, menunjukkan aktivitas antimalaria dengan nilai $IC_{50} = 4,23$ μ g/ml. Fraksi metanol yang digunakan, diperoleh dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (Irian Jaya) yang difraksinasi menggunakan kromatografi kolom terbuka.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut di atas mendasari untuk melakukan uji aktivitas antimalaria fraksi dari ekstrak metanol yang diperoleh dengan metode fraksinasi yang berbeda dari fraksinasi yang pernah dilakukan

sebelumnya. Metode yang digunakan pada fraksinasi sebelumnya menggunakan kromatografi kolom terbuka sedangkan pada penelitian ini digunakan kromatografi kolom vakum (VLC). Kemudian fraksi yang diperoleh diuji aktivitasnya secara *in vivo* pada mencit yang terinfeksi *P. berghei* dan diharapkan memiliki aktivitas yang lebih baik daripada sebelumnya.



3.2 Skema Kerangka Konseptual



BAB IV

BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

4.1.1. Bahan Tanaman

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah hasil fraksinasi ekstrak metanol dari kulit batang tanaman cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.). Tanaman ini diperoleh dari daerah Bogor pada bulan Februari (2005) dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bogor, Jawa Barat.

4.1.2. Parasit Uji

Parasit yang digunakan adalah biakan *Plasmodium berghei* galur ANKA yang diperoleh dari Laboratorium Malaria, Lembaga Biomolekuler Eijkman, Jakarta dan dibiakkan di laboratorium hewan Universitas Airlangga, Surabaya melalui kultivasi pada mencit.

4.1.3. Hewan Coba

Pada penelitian ini digunakan hewan coba yaitu mencit jantan galur Balb/C dengan interval berat badan 20 – 30 gram dan umur \pm 2 bulan, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya.

4.1.4. Bahan Pembanding

Bahan pembanding (kontrol positif) yang digunakan dalam penelitian ini adalah klorokuin difosfat (Sigma C-6628, 25 gram, lot 7740650). Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO.

4.1.5. Bahan lain untuk Uji Antimalaria *In Vivo*

Bahan pendukung yang dipergunakan antara lain media Alceiver, pewarna Giemsa, metanol absolut, dan minyak emersi.

4.1.6 Pelarut

Pelarut yang digunakan antara lain : n-Heksana (teknis-redestilasi), diklorometana (teknis-redestilasi), metanol (teknis-redestilasi), dan aqua bidestilata.

4.2 Alat-alat yang digunakan

4.2.1 Alat untuk Ekstraksi

Pada proses ekstraksi digunakan alat-alat seperti Timbangan Analitik (OHAUS 2140), Toples, Gelas ukur, Beaker Glass, Erlenmeyer, Rotavapor (Buchi R-114 dan Buchi R-153), Batang Pengaduk, dan Cawan Porselen.

4.2.2 Alat untuk Fraksinasi

Untuk fraksinasi digunakan Pompa Vakum, *Scinterred Glass Funnel* (Pyrex), Vial, Gelas Ukur, Cawan Porselen, Erlenmeyer, dan Rotavapor.

4.2.2 Alat untuk Uji Antimalaria secara *In Vivo*

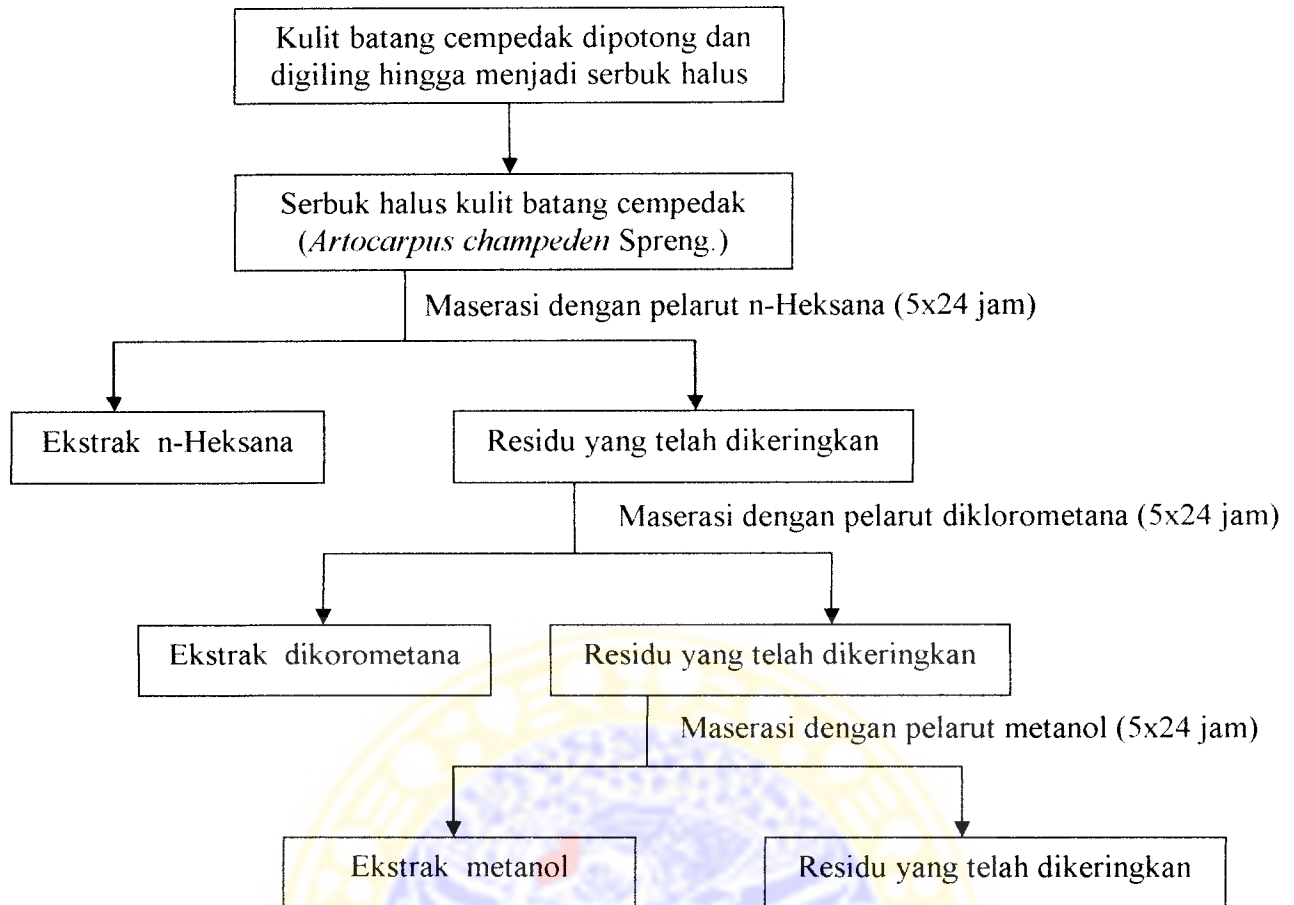
Pada tahap ini digunakan alat-alat sebagai berikut : Neraca Analitik, Lemari Pendingin, Mikroskop dengan skala okuler (Olympus CH 20), Gelas Obyek, Spuit Injeksi (Terumo), Jarum Suntik (36 ½ G), Vial, dan pipet.

4.3. Metode Penelitian

4.3.1 Pembuatan Ekstrak Metanol kulit batang *Artocarpus champeden* Spreng.

Simplisia kering kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) dipotong kecil-kecil dan digiling sehingga diperoleh serbuk halus. Serbuk halus sebanyak 2,5 kg dimaserasi dengan n-Heksan teknis yang telah di-redestilasi sebanyak 2500 mL selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Maserasi dilakukan sebanyak 5 kali. Kemudian, disaring dan ekstrak dipisahkan. Residu dikeringkan (dengan di angin-anginkan) dan dimaserasi kembali dengan pelarut diklorometana sebanyak 2500 mL (selama 5 x 24 jam).

Setelah disaring dan ekstrak diklorometana dipisahkan, residu yang telah dikeringkan, dimaserasi kembali dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 2500 mL (selama 5 x 24 jam). Kemudian, ekstrak disaring dan diuapkan dengan rotavapor vakum sehingga diperoleh ekstrak metanol pekat. Terhadap ekstrak metanol dilakukan fraksinasi dengan metode VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*).



Gambar 4.1 Skema pembuatan ekstrak metanol dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden Spreng.*)

4.3.2 Pembuatan Fraksi Metanol menggunakan metode Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Cepat.

Ekstrak kering metanol difraksinasi menggunakan Kromatografi Kolom Cepat

Bahan : Ekstrak kering metanol

Fase diam : Silika Gel GF₂₅₄

Fase gerak : 1. CHCl₃ : Etil asetat = 1 : 9

2. CHCl₃ : Metanol = 9 : 1

3. Metanol 100 %

Cara kerja :

1. Fase diam silika gel GF₂₅₄ ± 60 gram dimasukkan kedalam *scinterring glass* sedikit demi sedikit. Ditekan-tekan sambil dihisap dengan pompa hisap agar mampat.

4.3.4. Penginfeksian *Plasmodium berghei* dan Perhitungan % Parasitemia.

1. Pembiakan *Plasmodium berghei* pada mencit donor

Langkah-langkah penginfeksian mencit donor :

1. Diambil simpanan beku darah terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam medium Alceiver (1 : 3).
2. Dihangatkan dalam telapak tangan sambil diputar-putar sampai suhu sama dengan suhu tangan (*thawing*).
3. Darah diinjeksikan sebanyak 200 μ l ke masing-masing mencit secara *intrapertoneal*.
4. Diamati persen parasitemia dengan cara mengambil satu tetes darah dari ekor dan dibuat hapusan darah tipis dengan pewarna Giemsa.
5. Setelah persen parasitemia mencapai > 20 %, dilakukan pembedahan untuk mengambil darah dari jantung (sebanyak \pm 1 mL), kemudian diencerkan dengan medium Alceiver (1 : 3).

2. Pembuatan Preparat Hapusan Darah Tepi

Pengamatan efek hasil fraksinasi ekstrak metanol terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit terinfeksi dilakukan setiap hari dengan membuat preparat darah dan menghitung jumlah parasitemia.

Proses preparasi dilakukan sebagai berikut :

1. Ditetaskan \pm 1 tetes suspensi darah ke atas gelas objek, lalu diratakan dengan bantuan satu sisi gelas objek yang lain.
2. Dibiarkan kering di udara terbuka.
3. Dilakukan fiksasi dalam metanol absolut selama beberapa saat.
4. Gelas objek yang sudah difiksasi, dikeringkan di udara terbuka.
5. Dilakukan pengecatan dengan pewarna Giemsa.
6. Hapusan darah tepi tersebut diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Untuk parasit malaria inti berwarna kemerahan, plasma berwarna biru, dan eritrosit berwarna pink.

2. Kelompok kontrol negatif diberi DMSO 100 μ l/ Kg BB mencit secara *intraperitoneal* selama 4 hari ($D_0 - D_3$).
3. Pengambilan sampel darah ekor dan pengamatan persen parasitemia dilakukan sebelum mencit diberi perlakuan dan setiap hari setelah perlakuan dimulai sampai hari ke-7 setelah perlakuan ($D_0 - D_6$).

Setelah diujikan kepada mencit, maka dihitung persen penghambatan dari tiap fraksi. Fraksi yang memiliki persen penghambatan paling besar dan dianggap paling aktif sebagai antimalaria, diuji lebih lanjut untuk menentukan ED_{50} .

4.3.6 Penentuan ED_{50} Fraksi Metanol yang Aktif terhadap *P. berghei*

1. Penyiapan Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah fraksi metanol yang aktif dengan kelompok dosis 10; 1; 0,1; 0,01 dan 0,001 mg /kg BB mencit dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Ditimbang 10 mg fraksi metanol yang paling poten dengan timbangan analitik, lalu dilarutkan dengan DMSO ad tepat larut. Ditambah DMSO ad tepat 4,0 mL. Dikocok ad homogen (larutan uji I dengan dosis 10 mg/kg BB).
2. Larutan uji I dipipet 200 μ L kedalam vial, kemudian ditambah 1800 μ L DMSO. Dikocok ad homogen (larutan uji II dengan dosis 1 mg/kg BB).
3. Larutan uji II dipipet 200 μ L kedalam vial, kemudian ditambah 1800 μ L DMSO. Dikocok ad homogen (larutan uji III dengan dosis 0,1 mg/kg BB).
4. Larutan uji III dipipet 200 μ L kedalam vial, kemudian ditambah 1800 μ L DMSO. Dikocok ad homogen (larutan uji IV dengan dosis 0,01 mg/kg BB).
5. Larutan uji IV dipipet 200 μ L kedalam vial, kemudian ditambah 1800 μ L DMSO. Dikocok ad homogen (larutan uji V dengan dosis 0,001 mg/kg BB).

2. Penyiapan Larutan Kontrol Negatif

Sebagai kontrol negatif digunakan DMSO sebanyak 100 $\mu\text{L}/\text{kg}$ BB. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif karena tidak mempengaruhi pertumbuhan parasit.

3. Teknik Uji Aktivitas Antimalaria *In Vivo*

Mencit terinfeksi parasit dibagi menjadi 7 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 3 mencit, masing-masing diberi perlakuan sebagai berikut :

- I. Kelompok uji dengan dosis 10 mg/kg BB.
- II. Kelompok uji dengan dosis 1 mg/kg BB.
- III. Kelompok uji dengan dosis 0,1 mg/kg BB.
- IV. Kelompok uji dengan dosis 0,01 mg/kg BB.
- V. Kelompok uji dengan dosis 0,001 mg/kg BB.
- VI. Kelompok kontrol negatif.

Setelah mencit coba dan mencit kontrol mencapai tingkat parasitemia antara 1 – 5 % maka pengujian aktivitas anti malaria dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor mencit untuk dihitung parasitemia pada hari sebelum pemberian bahan uji. Pengambilan sampel darah ekor dilakukan sebelum mencit diberi perlakuan. Pengambilan darah dilakukan setiap hari setelah perlakuan dimulai ($D_0 - D_6$).
2. Fraksi uji, dengan berbagai tingkat dosis / kg BB disiapkan beserta *syringe* yang akan digunakan.
3. Setiap kelompok uji diberikan fraksi uji secara *intraperitoneal* sebanyak 100 μl / kg BB tiap dosis.

4. Pengamatan Aktivitas Fraksi Metanol yang Aktif

Dari hapusan darah tepi diamati jumlah eritrosit yang sudah terinfeksi parasit malaria tiap 5000 eritrosit. Kemudian dihitung % parasitemia dengan rumus :

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

% pertumbuhan dan % penghambatan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \frac{P(d_1 - d_0) + P(d_3 - d_2) + P(d_4 - d_3) + \dots + P(d_6 - d_5)}{6}$$

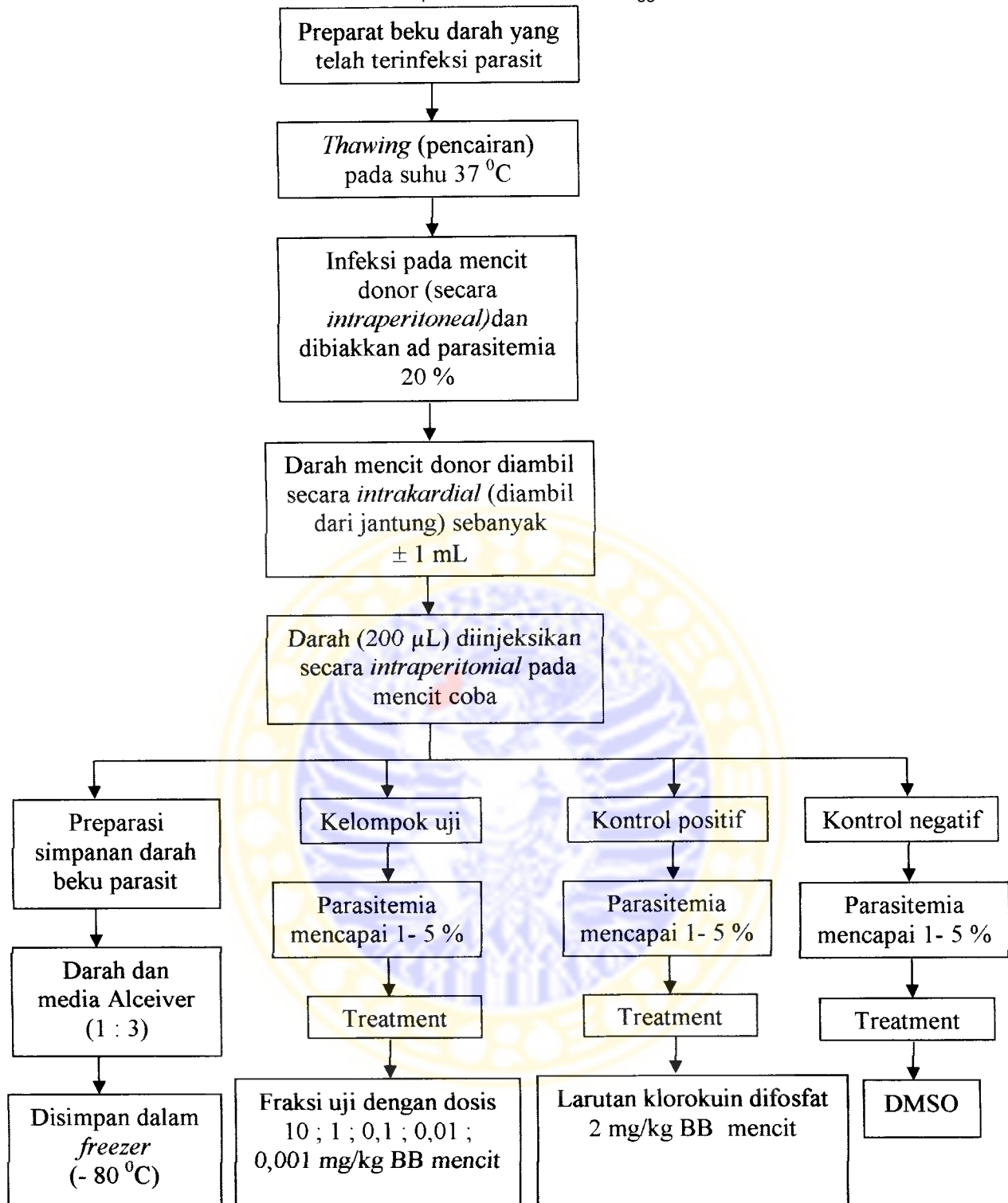
$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \frac{X_e}{X_k} \times 100 \%$$

X_e = % pertumbuhan rata-rata parasit pada tiap dosis bahan uji

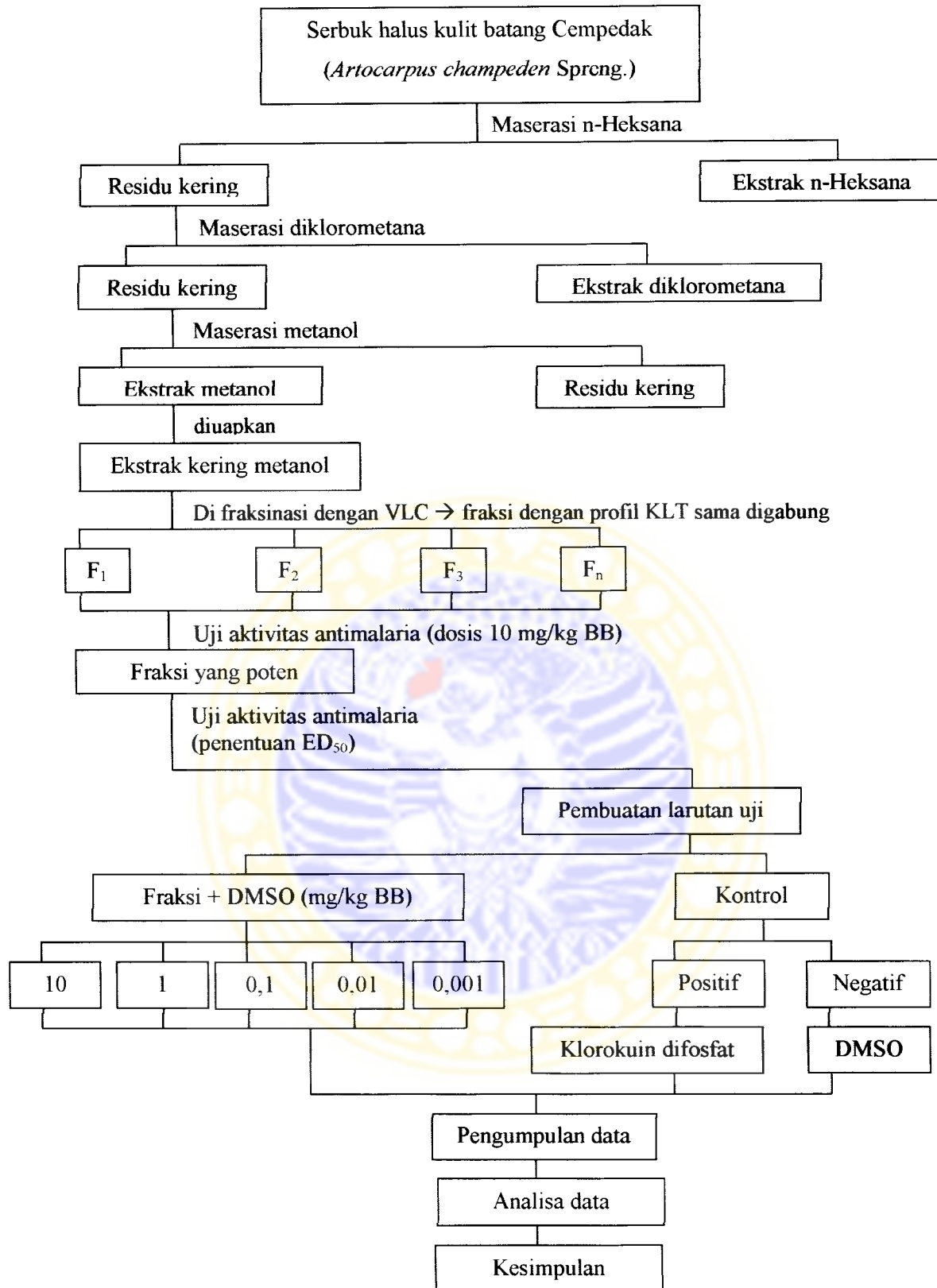
X_k = % pertumbuhan rata-rata parasit pada kontrol negatif.

5. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis probit yang digunakan untuk menghitung ED_{50} (dosis yang mampu menghambat 50 % pertumbuhan *P. berghei* secara *in vivo*). Untuk menentukan nilai ED_{50} digunakan analisis probit (menggunakan SPSS), dengan membuat kurva hubungan antara probit (*probability unit*) prosentase penghambatan dengan logaritma kadar menggunakan persamaan garis linier.



Gambar 4.2 Skema penyiapan parasit uji fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) terhadap pertumbuhan *P. berghei* *in vivo*

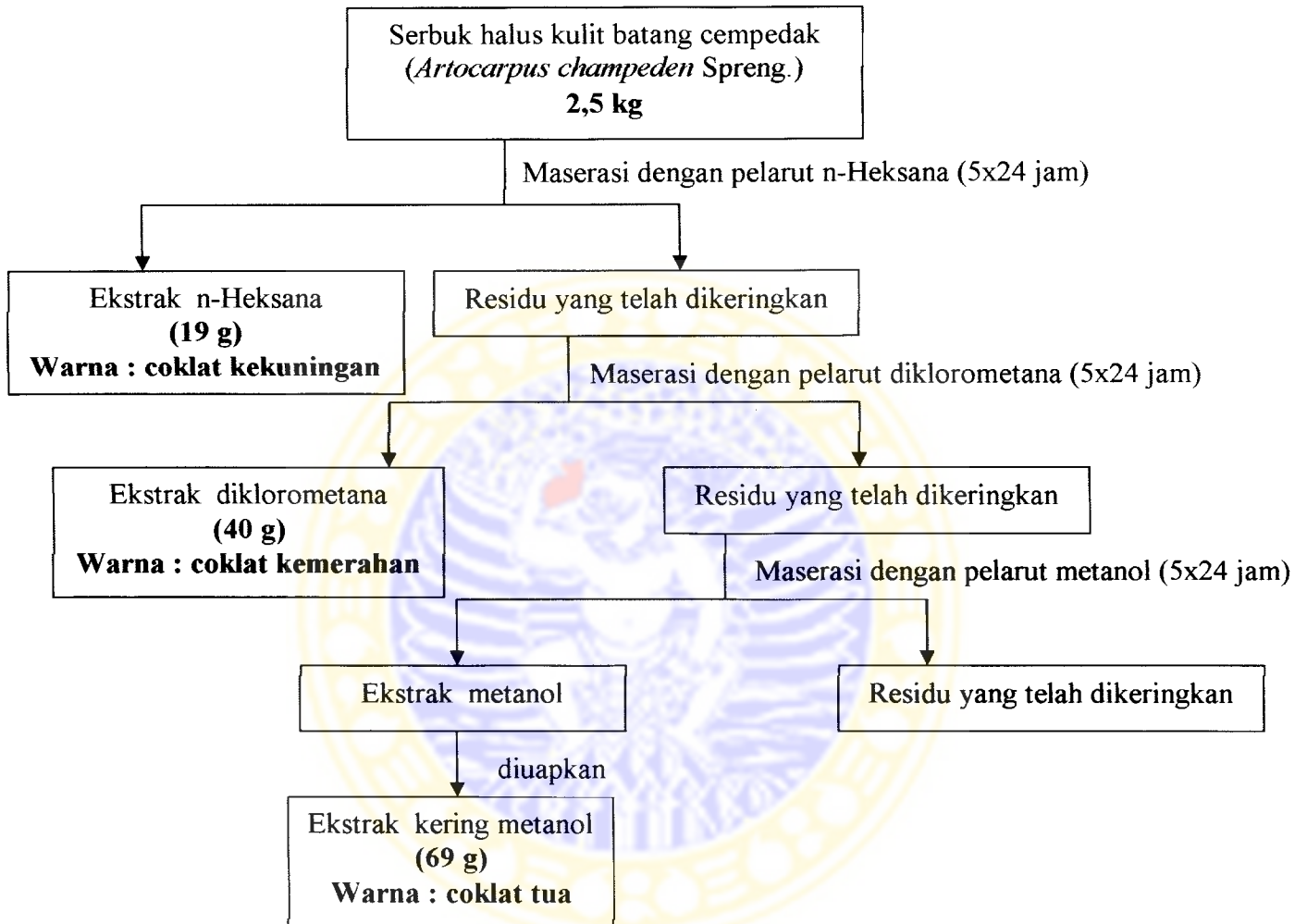


Gambar 4.3 Skema rancangan penelitian dan uji aktivitas antimalaria fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei in vivo*

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Pembuatan Ekstrak Metanol Kulit Batang *A. champeden* Spreng.



5.2 Pembuatan Fraksi Metanol *Artocarpus champeden* Spreng.

Ekstrak kering metanol difraksinasi menggunakan metode VLC (*Vaccum Liquid Chromatography*)

- Bahan : Ekstrak kering metanol \pm 6 gram
 Fase diam : Silika Gel GF₂₅₄ \pm 60 gram
 Fase gerak : 1. CHCl₃ : Etil asetat = 1 : 9 = 900 mL
 2. CHCl₃ : Metanol = 9 : 1 = 200 mL
 3. Metanol 100 % = 200 mL

Penampungan : tiap 20 mL

Dari hasil fraksinasi ekstrak metanol dengan metode VLC diperoleh 55 fraksi. Berdasarkan identifikasi KLT dengan fase diam *silica gel* GF₂₅₄ dan fraksi gerak CHCl₃ : Metanol 5%, fraksi-fraksi yang memiliki profil KLT yang sama dikumpulkan menjadi satu sehingga diperoleh 5 fraksi utama. Hasil pengumpulan dan perolehan fraksi dari ekstrak metanol yang difraksinasi dengan VLC dapat dilihat pada tabel 5.1. dan profil KLT 5 fraksi utama metanol dapat dilihat pada gambar 5.1.

Tabel 5.1. Hasil penimbangan Fraksi Metanol Kulit Batang *A. champeden* Spreng.

Kode fraksi	Berat zat (gram)	No. pengumpulan vial
F I M	0,8 mg	1
F II M	1102,9	2-12
F III M	154,6	13-35
F IV M	52,4	36-45
F V M	2456,5	46-55

5.3 Identifikasi Fraksi Metanol kulit batang *A. champeden* Spreng.

Dari hasil fraksinasi diperoleh sebanyak 5 fraksi utama, kemudian masing-masing fraksi di-identifikasi dengan KLT. Profil KLT dari masing-masing fraksi adalah seperti terlihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 5.1. Kromatogram hasil KLT dari 5 fraksi metanol kulit batang *A. champeden* Spreng. Fase diam *silica gel GF₂₅₄*. Fase gerak CHCl_3 : Metanol 5%. Penampak noda cerrium (IV) sulfat 1%



Gambar 5.2. Kromatogram hasil KLT dari 5 fraksi metanol kulit batang *A. champeden* Spreng. Fase diam *silica gel GF₂₅₄*. Fase gerak CHCl_3 : Metanol 5%. Diamati pada UV 365 nm.

5.4. Uji Pendahuluan Aktivitas Antimalaria.

Uji pendahuluan aktivitas antimalaria dilakukan pada mencit BALB/c jantan yang terinfeksi *P. berghei*. Larutan uji yang diberikan adalah larutan fraksi metanol (F II M sampai F V M) dengan dosis 10 mg/kg BB mencit. Untuk fraksi metanol (F I M) tidak dapat dilakukan uji pendahuluan aktivitas antimalaria karena fraksi yang dihasilkan sangat sedikit.

Larutan uji diberikan selama 4 hari secara *intraperitoneal*. Pengamatan efek larutan fraksi metanol terhadap pertumbuhan *P. berghei* dilakukan setiap hari (selama 7 hari) dengan membuat hapusan darah dan menghitung jumlah parasitemia. Hapusan darah dibuat dengan pewarnaan Giemsa 10 % selama 10 menit, diamati dengan mikroskop perbesaran 1000 kali. Hasil pengamatan aktivitas antimalaria dapat diamati pada tabel 5.2. dan 5.3, sedangkan perhitungan dapat dilihat pada lampiran 3, lampiran 4 dan lampiran 5.

Tabel 5.2. Persen Parasitemia dari hapusan darah tipis ekor mencit BaLB/c jantan yang terinfeksi *P. berghei* dengan pewarnaan Giemsa 10 % selama 10 menit, pada uji Pendahuluan Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M – F V M) Kulit Batang *A. champeden* Spreng. Dengan dosis 10 mg/kg BB dan Kontrol Negatif *in vivo*, yang diamati selama D₀ – D₆ pada mikroskop cahaya perbesaran 1000 kali.

Keterangan	Rep.	% parasitemia						
		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
F II M	1.	0,28	0,64	1,75	3,30	4,75	8,92	12,17
	2.	0,46	0,73	1,77	3,28	4,64	9,42	13,35
	3.	0,49	1,18	1,97	3,76	5,74	10,10	13,79
F III M	1.	0,95	3,97	5,92	9,55	10,37	13,95	17,80
	2.	1,03	4,86	6,88	9,28	10,95	12,55	17,21
	3.	0,66	3,37	6,78	11,95	12,57	13,94	18,97
F IV M	1.	0,37	3,31	3,73	10,32	13,37	16,37	18,23
	2.	0,49	2,82	7,74	10,02	13,37	15,30	19,45
	3.	0,64	3,23	6,20	9,40	13,06	16,33	18,50
F V M	1.	0,47	2,72	4,78	5,16	7,24	11,80	15,77
	2.	0,56	3,65	6,04	8,68	10,16	12,87	15,04
	3.	0,78	3,95	7,05	8,41	11,29	14,34	16,50
Kontrol (-)	1.	0,70	3,15	9,51	12,50	15,38	18,08	26,02
	2.	0,76	3,84	12,09	14,65	16,10	20,36	26,67
	3.	0,67	2,64	11,05	17,51	20,37	23,86	25,93

D₀ – D₆ : Hari ke-0 sampai ke-6

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

Dari hasil penghitungan persen parasitemia, dapat dilakukan penghitungan persen pertumbuhan dan persen penghambatan fraksi metanol kulit batang *A.champeden* Spreng. dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \frac{P(d_1 - d_0) + P(d_2 - d_1) + P(d_3 - d_2) + P(d_4 - d_3)}{4}$$

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \frac{X_e}{X_k} \times 100 \%$$

Keterangan :

Xe = % pertumbuhan rata-rata parasitemia pada tiap dosis bahan uji

Xk = % pertumbuhan rata-rata parasitemia pada kontrol negatif.

Tabel 5.3. Hasil Perhitungan Persen Pertumbuhan dan Persen Penghambatan Parasit dari Fraksi Metanol (F II M – F V M) kulit batang *A.champeden* Spreng. dan Kontrol Negatif terhadap mencit BaLB/c jantan terinfeksi *P. berghei*.

Kode fraksi	% Pertumbuhan (replikasi)				% Penghambatan
	I	II	III	Rata-rata	
F II M	1,12	1,02	1,31	1,16	72,05
F III M	1,69	2,40	2,63	2,24	46,02
F IV M	2,36	2,48	2,98	2,61	37,11
F V M	3,25	3,22	3,11	3,19	23,13
K (-)	3,67	3,84	4,93	4,15	-

Dari uji pendahuluan ini, didapatkan bahwa fraksi metanol (F II M) memiliki aktifitas antimalaria yang paling baik dibandingkan ke-3 fraksi metanol lainnya (% penghambatan 72,05 %). Oleh karena itu, dilakukan uji aktivitas antimalaria terhadap fraksi metanol (F II M) dengan lima dosis untuk mendapatkan nilai ED₅₀.

5.5 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M) dan Kontrol Negatif *In Vivo*.

Uji aktivitas antimalaria dilakukan pada mencit BALB/c jantan yang terinfeksi *P. berghei*. Larutan uji yang diberikan adalah larutan fraksi metanol (F II M) dengan 5 macam dosis. Larutan uji diberikan selama 4 hari secara *intraperitoneal*.

Pengamatan efek larutan fraksi metanol terhadap pertumbuhan *P. berghei* dilakukan setiap hari (selama 7 hari) dengan membuat preparat darah dan menghitung jumlah parasitemia. Hapusan darah dibuat dengan pewarnaan Giemsa 10 % selama 10 menit, diamati dengan mikroskop perbesaran 1000 kali. Hasil pengamatan aktivitas antimalaria dapat diamati pada tabel 5.4, sedangkan perhitungan dapat dilihat pada lampiran 3.



Tabel 5.4. Persen Parasitemia dari hapusan darah tipis ekor mencit BaLB/c jantan yang terinfeksi *P. berghei* dengan pewarnaan Giemsa 10 % selama 10 menit, pada Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M) Kulit Batang *A. champeden* Spreng. dan Kontrol Negatif *in vivo*, yang diamati selama D₀ – D₆ pada mikroskop cahaya perbesaran 1000 kali.

Keterangan	Rep.	% parasitemia						
		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
Dosis 10 mg/kg BB mencit	1.	0,34	1,15	1,18	2,77	3,72	8,24	12,06
	2.	0,46	0,73	1,77	3,28	4,64	9,42	13,35
	3.	0,55	1,56	3,28	3,66	4,20	12,06	17,51
Dosis 1 mg/kg BB mencit	1.	0,79	2,04	2,70	3,30	5,70	11,24	17,38
	2.	0,46	0,79	1,96	3,10	5,05	10,42	14,84
	3.	0,42	1,13	2,21	3,59	4,82	10,11	13,59
Dosis 0,1 mg/kg BB mencit	1.	0,44	1,46	2,42	4,93	6,88	12,09	18,08
	2.	0,87	1,47	2,10	4,99	7,44	10,43	16,80
	3.	0,53	1,19	2,33	4,28	6,48	12,27	16,25
Dosis 0,01 mg/kg BB mencit	1.	0,57	1,32	2,70	6,20	7,81	11,17	19,21
	2.	0,42	1,48	5,41	6,32	8,69	15,61	-
	3.	0,51	2,64	4,15	5,47	8,25	13,23	16,38
Dosis 0,001 mg/kg BB mencit	1.	0,34	1,71	5,37	7,63	8,68	12,10	17,91
	2.	0,58	1,16	5,13	7,52	9,65	14,54	16,72
	3.	0,35	1,74	4,77	7,69	9,16	13,87	18,54
Kontrol (-)	1.	0,97	3,41	5,91	8,49	14,44	17,82	26,67
	2.	0,81	4,11	7,79	10,97	14,40	20,03	30,17
	3.	0,94	5,33	10,59	15,13	17,38	24,80	28,86

D₀ – D₆ : Hari ke-0 sampai ke-6

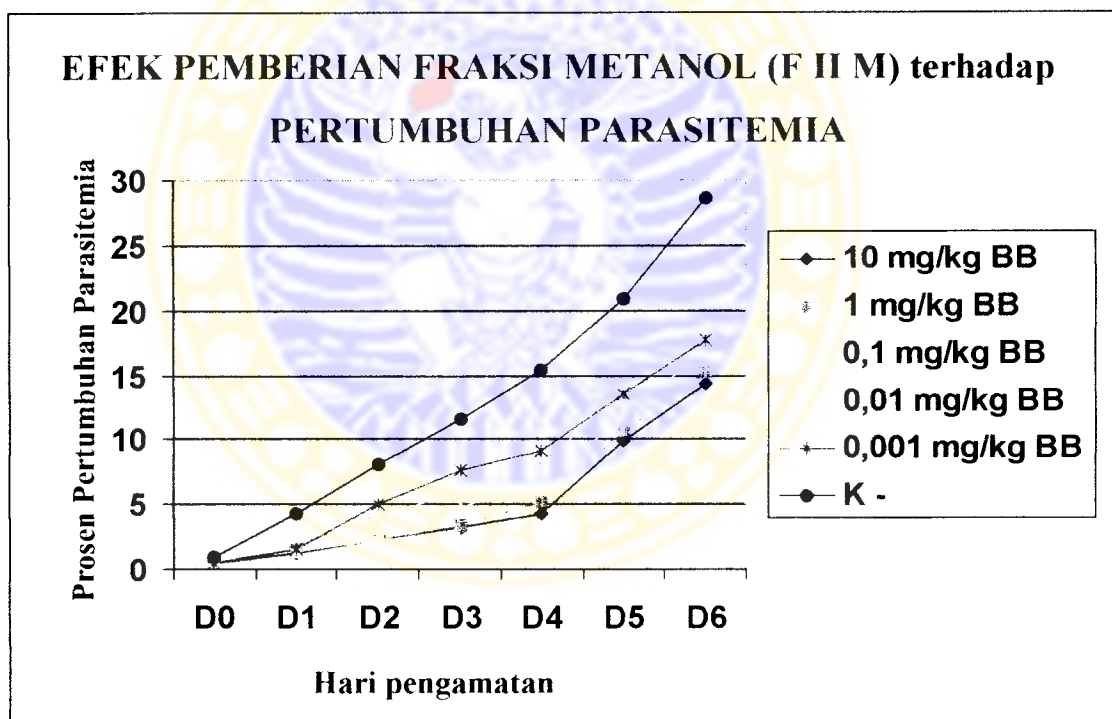
$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\sum \text{eritrosit yang terinfeksi}}{\sum \text{eritrosit total}} \times 100 \%$$

Berdasarkan data perhitungan persen parasitemia hari ke-0 sampai hari ke-6, maka dapat ditentukan persen parasitemia rata-rata fraksi metanol (F II M) (Tabel 5.5.) dan grafik hubungan persen pertumbuhan parasitemia dengan dosis dari fraksi metanol (F II M) kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) (Gambar 5.3) sebagai berikut :

Tabel 5.5. Persen Parasitemia rata-rata dari *P. berghei* pada pemberian Fraksi Metanol (F II M) Kulit Batang *A. champeden* Spreng. dan Kontrol Negatif *in vivo*.

Keterangan	% Parasitemia						
	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
Dosis 10 mg/kg BB mencit	0,45	1,15	2,31	3,24	4,19	9,91	14,31
Dosis 1 mg/kg BB mencit	0,56	1,32	2,29	3,33	5,19	10,59	15,27
Dosis 0,1 mg/kg BB mencit	0,61	1,37	2,28	4,73	6,93	11,60	17,04
Dosis 0,01 mg/kg BB mencit	0,50	1,81	4,09	6,00	8,25	13,34	17,80
Dosis 0,001 mg/kg BB mencit	0,42	1,54	5,09	7,61	9,16	13,50	17,72
Kontrol (-)	0,91	4,28	8,10	11,53	15,41	20,88	28,57

Berdasarkan data pada tabel 5.5., maka dapat dibuat grafik hubungan antara persen pertumbuhan parasit *P. berghei* dengan dosis fraksi metanol (F II M) yang diberikan selama 7 hari. Dari gambar 5.3. dapat diketahui bahwa pada semua dosis fraksi metanol (F II M) yang diberikan secara *intraperitoneal* pada mencit BALB/c jantan mampu menghambat pertumbuhan parasit. Walaupun masih terlihat adanya peningkatan parasitemia selama 7 hari pemberian fraksi metanol (F II M), namun rata-rata pertumbuhan parasit pada kelompok uji masih dibawah pertumbuhan parasit pada kelompok kontrol negatif. Dosis fraksi metanol (F II M) tertinggi (10 mg/kg BB mencit) memberikan hambatan pertumbuhan parasit yang paling tinggi. Dengan demikian jelas terlihat bahwa fraksi metanol (F II M) dari kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) dapat menghambat pertumbuhan parasit *P. berghei* pada mencit.



Gambar 5.3. Grafik Hubungan Persen Parasitemia dengan Hari Pemberian Fraksi Metanol (F II M) kulit batang *A. champeden* Spreng. Dalam 5 dosis dan kontrol negatif terhadap mencit BaLB/c jantan terinfeksi *P. berghei* selama pengamatan D₀-D₆

Berdasarkan data persen parasitemia rata-rata dari fraksi metanol (F II M) kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.), maka dapat ditentukan persen pertumbuhan dan penghambatan rata-rata fraksi metanol (F II M) seperti pada tabel 5.6. (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4 dan lampiran 5).

Tabel 5.6. Hasil Perhitungan Persen Pertumbuhan dan Persen Penghambatan Parasit dari Fraksi Metanol (F II M) kulit batang *A.champeden* Spreng. dan Kontrol Negatif terhadap mencit BaLB/c jantan terinfeksi *P. berghei*.

Dosis (mg/kg BB mencit)	Rep.	Pertumbuhan		Penghambatan	
		%	Rata-rata	%	Rata-rata
10	1.	0,84	0,93	76,86	74,38
	2.	1,04		71,35	
	3.	0,91		74,93	
1	1.	1,23	1,16	66,12	68,04
	2.	1,15		68,32	
	3.	1,10		69,69	
0,1	1.	1,61	1,58	55,65	56,47
	2.	1,64		54,82	
	3.	1,49		58,95	
0,01	1.	1,81	1,94	50,14	46,56
	2.	2,07		42,98	
	3.	1,93		46,83	
0,001	1.	2,08	2,18	42,70	39,86
	2.	2,27		37,47	
	3.	2,20		39,39	
Kontrol (-)	1.	3,37	3,63	-	-
	2.	3,40		-	
	3.	4,11		-	

5.6. Analisa Data Fraksi Metanol (F II M) Kulit Batang *A. champeden Spreng.*

Dari data persen penghambatan dari setiap dosis uji aktivitas antimalaria terhadap *P. berghei*, dilakukan analisa dengan menggunakan analisis probit. Dari hasil analisis probit tersebut, diperoleh data mengenai *Effective dose* (ED_{50}) dari fraksi metanol (F II M) terhadap pertumbuhan *P. berghei* pada mencit.

Tabel 5.7. Harga ED_{50} dari Fraksi Metanol (F II M) dan Klorokuin Difosfat

Nama Bahan	Harga ED_{50}
Fraksi Metanol (F II M)	0,02 mg/kg BB mencit
* Klorokuin Difosfat	0,11 mg/kg BB mencit

* → Data Sekunder (Virianti, 2007)

Dari tabel 5.7. terlihat bahwa fraksi metanol (F II M) dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei in vivo* dengan ED_{50} sebesar 0,02 mg/kg BB, sedangkan untuk kontrol positif (klorokuin difosfat) memiliki ED_{50} sebesar 0,11 mg/kg BB. Hal ini berarti fraksi metanol (F II M) lebih poten dibandingkan dengan klorokuin difosfat.

BAB VI

PEMBAHASAN

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) yang berasal dari Bogor. Telah diketahui bahwa cempedak terbukti secara empiris mempunyai aktivitas antimalaria.

Pada penelitian ini digunakan fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) sebagai bahan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* dengan rute *intraperitoneal*. Dari penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa aktif (flavonoid) yang berperan sebagai antimalaria. Untuk lebih mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria, dilakukan pemisahan pada ekstrak metanol dengan menggunakan metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC).

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Prinsip dari proses maserasi adalah pencapaian kesetimbangan konsentrasi larutan yang mengandung bahan aktif yang larut dengan bahan aktif yang belum larut. Ekstrak yang diperoleh, dihilangkan pelarutnya untuk mencegah hasil positif palsu pada saat uji aktivitas antimalaria. Pelarut yang digunakan dalam penelitian adalah n-Heksana, diklorometana, dan metanol. Pelarut n-Heksana digunakan dalam untuk mengekstraksi senyawa-senyawa non-polar seperti lemak. Sedangkan diklorometana digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa semi polar seperti flavonoid aglikon. Dan, metanol digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa polar seperti flavonoid glikosida. Dari proses maserasi ini, didapatkan tiga ekstrak kering yaitu ekstrak n-Heksana, ekstrak diklorometana dan ekstrak metanol.

Ekstrak kering metanol yang telah diperoleh, difraksinasi dengan menggunakan metode VLC. Keuntungan dari VLC adalah dengan adanya kondisi vakum, menyebabkan penarikan senyawa terjadi dengan cepat sehingga senyawa-senyawa yang mudah menguap dapat diperoleh. Dari proses fraksinasi ini didapat lima fraksi metanol yaitu fraksi (F I M) sampai fraksi (F V M).

lebih rendah bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (Ernawati, 2005), fraksi metanol (F II M) dapat dikatakan lebih aktif sebagai antimalaria dibandingkan fraksi metanol (F5M) karena peningkatan parasitemia pada pemberian F II M lebih rendah bila dibandingkan dengan F5M.

Hasil penelitian dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-4 ($D_0 - D_4$) menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) pada dosis 0,001 mg/kg BB mencit, 0,01 mg/kg BB mencit, 0,1 mg/kg BB mencit, 1 mg/kg mencit dan 10 mg/kg BB mencit, menunjukkan persen penghambatan terhadap *P. berghei* masing-masing sebesar 39,86 %; 46,56 %; 56,47 %; 68,04 %; dan 74,38 %. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) kulit batang *A. champeden* Spreng. mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei in vivo* pada mencit. Sedangkan pada hari ke-5 dan hari ke-6 terjadi peningkatan pertumbuhan parasit pada mencit coba setelah pemberian larutan uji dihentikan. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) belum cukup poten sebagai antimalaria. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 5.5.

Dari hasil perhitungan prosen penghambatan rata-rata pada masing-masing dosis, dapat dilakukan analisis data dengan menggunakan analisis probit untuk mendapatkan nilai ED_{50} dari fraksi metanol (F II M). Nilai ED_{50} menunjukkan besarnya dosis fraksi metanol (F II M) yang dapat menghambat 50% pertumbuhan *P. berghei in vivo*. Hasil analisis probit menunjukkan bahwa fraksi metanol (F II M) kulit batang *A. champeden* Spreng. mempunyai nilai ED_{50} 0,02 mg/kg BB mencit.

Penelitian antimalaria secara *in vitro* juga dilakukan terhadap kelima fraksi dari ekstrak metanol (Nindatu, 2007). Dilaporkan bahwa fraksi metanol (F II M) memiliki potensi antimalaria lebih besar dari fraksi lainnya dengan IC_{50} sebesar 1,65 $\mu\text{g/mL}$. Dengan demikian, dari hasil uji *in vivo* dan *in vitro* diketahui bahwa fraksi metanol (F II M) mempunyai daya hambat yang prospektif dikembangkan sebagai antimalaria.

BAB VII

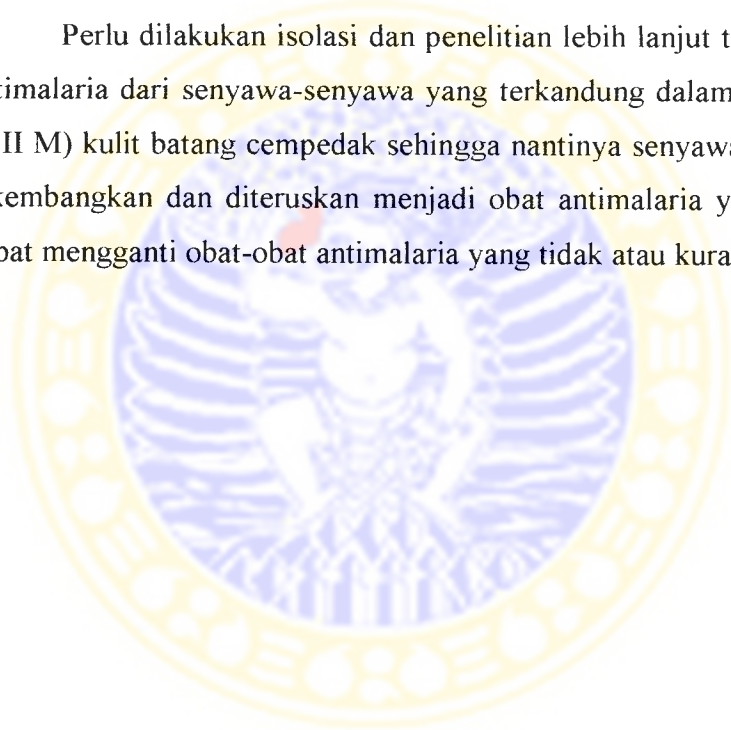
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Fraksi dari ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden* Spreng.) mempunyai aktivitas antimalaria terhadap pertumbuhan *P. berghei in vivo* pada mencit dan aktivitas terbesar diperlihatkan oleh fraksi metanol (F II M) dengan harga ED₅₀ sebesar 0,02 mg/kg BB.

7.2. Saran

Perlu dilakukan isolasi dan penelitian lebih lanjut terhadap potensi antimalaria dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi metanol (F II M) kulit batang cempedak sehingga nantinya senyawa tersebut dapat dikembangkan dan diteruskan menjadi obat antimalaria yang diharapkan dapat mengganti obat-obat antimalaria yang tidak atau kurang efektif.



DAFTAR PUSTAKA

- Andrade-Neto, V.F., Krettli, A.U., Brandao, M.L., Ferrari, W.M.S. 2001. **The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review**, Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.96 : 8, 1033-1042 Rio de Janeiro.
- Backer, C. A. and Backhuizen Van Den Brink, B. C., 1965. **Flora of Java Vol. II**. Groningen The Netherland : NVP. Noordhoff, hal. 19
- Bickii, J., Njifutie, N., Foyere, J.A., Basco, L.K., Ringwald, P., 2000. **In vitro Antimalarial Activity of Limonoids from Khaya grandifolia C.D.C (Meliaceae)**, Journal of Ethnopharmacology, 69, hal. 27 – 33
- Boonlaksiri, C., Oonant, W., Kongsaree, P., Kittakoo, P., Tanticharoen, M., and Thebtaranonth, Y., 1999. **An Antimalarial stilbene from *Artocarpus integer***. Journal of Phytochemistry, 54, hal. 415 – 417
- Cannell J. P, Richard, 1998. **Method in biotechnology : Natural product isolation**. hal . 4,129-130
- Chen, M., Theander, T.G., Hviid, L., Zhai, L., and Kharazmi, A., 1994. **Licochalcone A, a New Antimalarial Agent, Inhibits In Vitro Growth of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* and Protects Mice from *P. yoelli* Infection**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, hal. 1470 – 1475
- Ernawati, S., 2005. Skripsi : **Efek Antimalaria Fraksi Metanol (F5M) Kulit Batang *Artocarpus champeden* Spreng. Terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei* In Vivo**. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Finegold, S., M., **Laboratory Methods for Diagnosis of Parasite Infections**. 8th edition. Bailey and Scotts. hal. 839 – 843
- Finegold, S., M., and Ellen Jo Barone, **Diagnostic Microbiology**. 8th edition. Bailey and Scotts. hal. 539-544
- Gandahasada, S., 1998. **Parasitologi Kedokteran**, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 178 – 202
- Ganiswara, S., G., 2001, **Farmakologi dan Terapi**, Jakarta : Bagian Farmakologi Universitas Indonesia, hal. 547
- Hakim, E. H., 1998. **Artokarpin dan Heteroflavon-A, Dua senyawa flavonoid bioaktif dari *Artocarpus champeden***. <http://www.lp.itb.ac.id/product/pro-1/syamsul1.html> # artokarpin.

- Fidock, D., A., Rosenthal, P. J., Croft, S. L., Brun, R., and nwaka, S. **Antimalarial Drug Discovery : Efficacy Models for Compound Screening**. Nature Reviews. Volume 3. June 2004. Hal. 509-520
- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia II**, diterjemahkan oleh Balai Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, Hal. 669 – 670.
- Kevin, B.J., Purnomo, Fryauff, D.J., Supriatman, M., Leksana, B., Handali, S., dan Subianto, B., 1995. **Penelitian *In vivo* Tentang Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Klorokuin di Oksibil Irian Jaya**. Buletin Penelitian Kesehatan 23 (2), hal.49 – 54.
- Leiden University Medical Center 2002., **The *Plasmodium berghei* Research Model of Malaria**. [http:// www.lumc.nl/ 1040 research/ malaria/ model01.html](http://www.lumc.nl/1040_research/malaria/model01.html). Diakses tanggal 10 Oktober 2006
- Listyawan, A., 2005. Skripsi : **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Air Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) terhadap *Plasmodium berghei in vivo***. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Markus, Maximus. 2006. Tesis : **Isolasi dan Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Metanol, Fraksi dan Isolat-isolat dari Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.)**. Pascasarjana. Universitas Airlangga.
- Nindatu, Maria. 2007. Tesis : **Efek Flavonoid Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) terhadap Morfologi dan Aktivitas Biokimiawi Parasit Antimalaria**. Pascasarjana. Universitas Airlangga.
- Phillipson, J. D., 1991. **Assay for antimalarial and amoebicidal activities**. Methods in Plant Biochemistry, Volume 6, London : Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publisher, p. 140
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal Edisi 2**. Surabaya : Airlangga University Press, hal 84 – 86
- Utomo, N. D. W., 2003. Skripsi : **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Metanol Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) terhadap *Plasmodium berghei in vivo***. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Virianti, G., 2007. Skripsi : **Aktivitas Antimalaria Fraksi Etil Asetat Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) pada Mencit terinfeksi *Plasmodium berghei***. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Widyawaruyanti, A., 2004. **Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Diklorometana dan Metanol Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.)**. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.

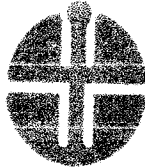
WHO, Division of Control Of Tropical Diseases, **Malaria**.
<http://www.micro.msb.le.ac.uk/224/Malaria.html>

Zaini, N.C., Dachlan, Y.P., Syafrudin. 2005. **Potensi dan Mekanisme Aksi Senyawa Aktif Antimalaria Kulit Batang Cempedak (*A.champeden Spreng.*)**. Laporan Penelitian HPTP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Zulkarnain, Iskandar, 1987. **Ilmu Penyakit Dalam**, Jilid I, edisi 2, Perhimpunan ahli Penyakit Dalam Indonesia, Balai Penerbit FKUI, hal. 75 – 79



LAMPIRAN 1
Surat Determinasi



LIPI

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002, Indonesia P.O Box 208 Bogor
Telp. (0251) 321038 - 321041 Fax. 325854

Bogor, 20 September 2005

Nomor : 786 /IPH.1.02/If.8/2005
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Dra. Aty Widyawaryanti, M.Si.**
Fak. Farmasi Univ. Airlangga
Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya
60286

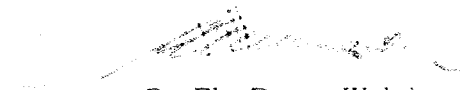
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Cempedak	<i>Artocarpus integer</i> (Thun) Merr.	Moraceae

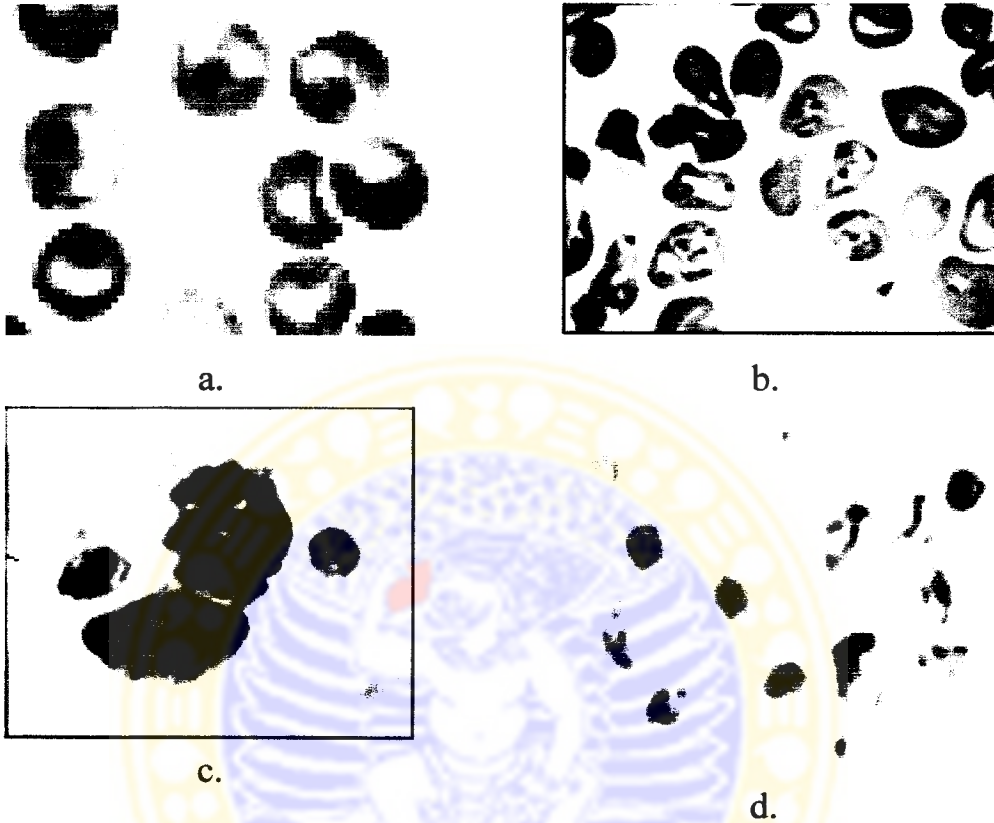
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 320001330

LAMPIRAN 2

Morfologi *Plasmodium berghei*



Keterangan :

- a. Bentuk cincin (*Ring Form*)
- b. Trofozoit
- c. Skizon
- d. Gametosit

Sumber : <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model01.html>

Lampiran 3

Pembuatan Larutan Bahan Uji

- Pembuatan larutan Fraksi Metanol (F II M) dari *A. champeden* Spreng.:

10,00 mg fraksi metanol (F II M) + 4 ml DMSO

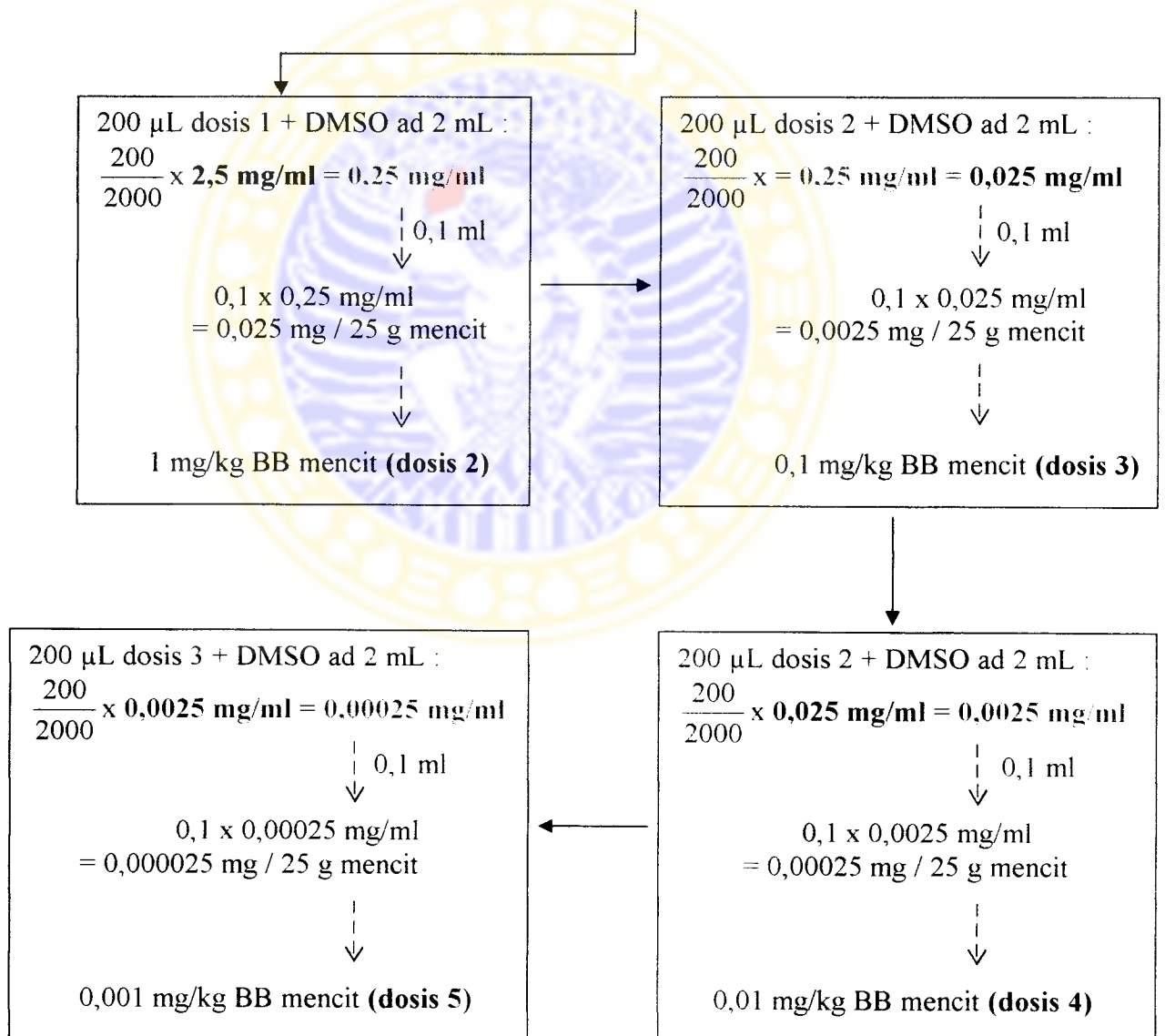
Didapatkan konsentrasi = 2,5 mg/ml

Larutan induk → 2,5 mg/ml

≈ untuk 0,1 ml = 0,1 x 2,5 mg/ml = 0,25 mg/ml

= 0,25 mg / 25 g mencit

= 10 mg/kg BB mencit (**dosis 1**)



Lampiran 4

Persen Parasitemia

Untuk menghitung prosen parasitemia digunakan rumus sebagai berikut:

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

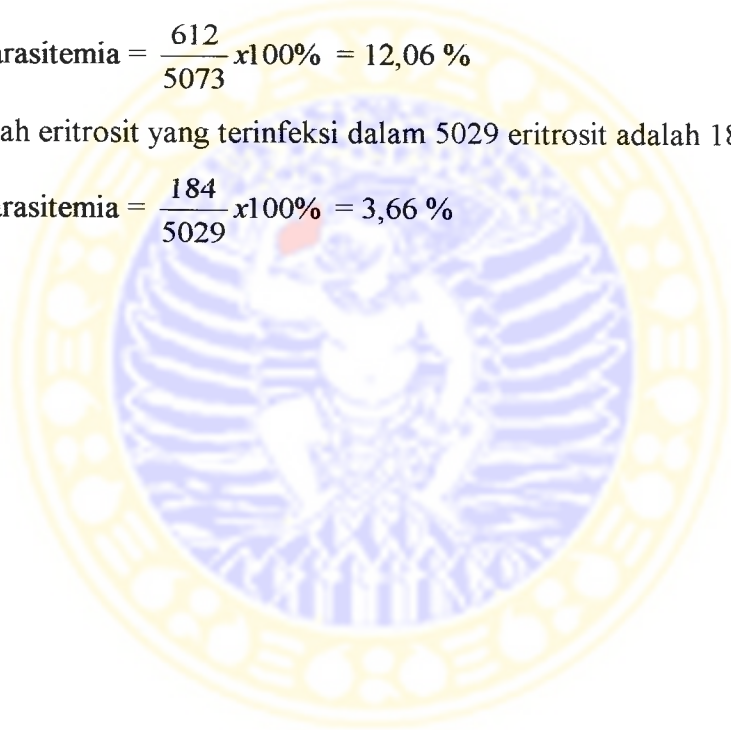
Contoh perhitungan persen parasitemia :

1. Jumlah eritrosit yang terinfeksi dalam 5073 eritrosit adalah 612

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{612}{5073} \times 100\% = 12,06 \%$$

2. Jumlah eritrosit yang terinfeksi dalam 5029 eritrosit adalah 184

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{184}{5029} \times 100\% = 3,66 \%$$



Hasil Perhitungan Jumlah Eritrosit Terinfeksi dan % Parasitemia hapusan darah tipis ekor mencit BaLB/c jantan yang terinfeksi *P. berghei* dengan pewarnaan Giemsa 10 % selama 10 menit, pada Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Metanol (F II M) Kulit Batang *A. champeden* Spreng., yang diamati selama D0 – D6 pada mikroskop cahaya perbesaran 1000 kali.

Dosis	Rep.	Ketr.	Hari						
			D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
10 mg/kg BB	1.	Σ EI	17/5015	58/5040	96/5120	140/5060	190/5112	426/5168	612/5073
		% P	0,34	1,15	1,18	2,77	3,72	8,24	12,06
	2.	Σ EI	24/5206	37/5040	92/5187	169/5145	239/5152	475/5040	679/5085
		% P	0,46	0,73	1,77	3,28	4,64	9,42	13,35
	3.	Σ EI	28/5006	79/5006	169/5146	184/5029	208/5185	617/5114	895/5112
		% P	0,55	1,56	3,28	3,66	4,20	12,06	17,51
1 mg/kg BB	1.	Σ EI	40/5050	106/5199	139/5145	165/5000	291/5107	577/5133	895/5150
		% P	0,79	2,04	2,70	3,30	5,70	11,24	17,38
	2.	Σ EI	23/5000	41/5188	99/5061	158/5094	259/5126	530/5084	748/5041
		% P	0,46	0,79	1,96	3,10	5,05	10,42	14,84
	3.	Σ EI	21/5009	57/5027	115/5198	183/5092	247/5120	512/5065	680/5005
		% P	0,42	1,13	2,21	3,59	4,82	10,11	13,59
0,1 mg/kg BB	1.	Σ EI	22/5054	74/5061	124/5124	253/5129	356/5175	613/5069	911/5040
		% P	0,44	1,46	2,42	4,93	6,88	12,09	18,08
	2.	Σ EI	45/5075	76/5183	106/5040	256/5125	373/5016	527/5054	860/5120
		% P	0,87	1,47	2,10	4,99	7,44	10,43	16,80
	3.	Σ EI	27/5038	60/5054	117/5020	214/5000	328/5061	627/5100	833/5125
		% P	0,53	1,19	2,33	4,28	6,48	12,27	16,25
0,01 mg/kg BB	1.	Σ EI	29/5075	68/5152	140/5173	316/5100	401/5136	561/5023	974/5070
		% P	0,57	1,32	2,70	6,20	7,81	11,17	19,21
	2.	Σ EI	21/5040	75/5060	277/5121	317/5016	438/5091	783/5017	-
		% P	0,42	1,48	5,41	6,32	8,69	15,61	-
	3.	Σ EI	26/5053	137/5192	214/5152	279/5104	414/5016	672/5081	821/5011
		% P	0,51	2,64	4,15	5,47	8,25	13,23	16,38
0,001 mg/kg BB	1.	Σ EI	17/5039	87/5083	269/5008	385/5048	441/5083	615/5084	906/5060
		% P	0,34	1,71	5,37	7,63	8,68	12,10	17,91
	2.	Σ EI	30/5146	58/5001	267/5208	384/5107	483/5006	734/5049	850/5084
		% P	0,58	1,16	5,13	7,52	9,65	14,54	16,72
	3.	Σ EI	17/5068	89/5103	243/5090	389/5060	465/5075	701/5053	904/5070
		% P	0,35	1,74	4,77	7,69	9,16	13,87	18,54

Hasil Perhitungan Jumlah Eritrosit Terinfeksi dan % Parasitemia hapusan darah tipis ekor mencit BaLB/c jantan yang terinfeksi *P. berghei* dengan pewarnaan Giemsa 10 % selama 10 menit, pada Kontrol Negatif, yang diamati selama D₀ – D₆ pada mikroskop cahaya perbesaran 1000 kali.

Dosis	Rep.	Ketr.	Hari						
			D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
K (-)	1.	Σ EI	50/5150	174/5100	298/5044	433/5100	722/5000	900/5050	1335/5005
		% P	0,97	3,41	5,91	8,49	14,44	17,82	26,67
	2.	Σ EI	41/5088	213/5184	401/5149	570/5198	726/5040	1028/5130	1519/5034
		% P	0,81	4,11	7,79	10,97	14,40	20,03	30,17
	3.	Σ EI	47/5000	266/5016	539/5088	788/5208	894/5145	1245/5020	1458/5052
		% P	0,94	5,33	10,59	15,13	17,38	24,80	28,86

Keterangan :

- Σ EI : Jumlah eritrosit yang terinfeksi / jumlah eritrosit total
- % P : Prosen parasitemia
- D₀ – D₆ : Hari ke-0 sampai dengan hari ke-6

Lampiran 5

Rata-rata Pertumbuhan Parasit (%)

Untuk menghitung persen pertumbuhan parasit digunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \frac{P(d_1 - d_0) + P(d_2 - d_1) + P(d_3 - d_2) + P(d_4 - d_3)}{\text{Jumlah hari} - 1}$$

Keterangan :

$P(D_x - D_{x-1}) = \% \text{ parasitemia hari ke-x dikurangi } \% \text{ parasitemia hari sebelumnya.}$

Apabila terjadi penurunan prosen parasitemia antara satu hari dan hari sesudahnya, maka pertumbuhan dianggap nol (0).

Contoh perhitungan prosen pertumbuhan parasit

Replikasi 1

- ❖ % parasitemia pada $D_0 = 0,97$
% parasitemia pada $D_1 = 3,41$
% pertumbuhan parasit = $3,41 - 0,97 = 2,44$
 - ❖ % parasitemia pada $D_1 = 3,41$
% parasitemia pada $D_2 = 5,91$
% pertumbuhan parasit = $5,91 - 3,41 = 2,50$
 - ❖ % parasitemia pada $D_2 = 5,91$
% parasitemia pada $D_3 = 8,49$
% pertumbuhan parasit = $8,49 - 5,91 = 2,58$
 - ❖ % parasitemia pada $D_3 = 8,49$
% parasitemia pada $D_4 = 14,44$
% pertumbuhan parasit = $14,44 - 8,49 = 5,95$
- % pertumbuhan parasit Replikasi 1 = $\frac{2,44 + 2,50 + 2,58 + 5,95}{4} = 3,37$

Replikasi 2

- ❖ % parasitemia pada $D_0 = 0,81$
% parasitemia pada $D_1 = 4,11$
% pertumbuhan parasit = $4,11 - 0,81 = 3,30$
 - ❖ % parasitemia pada $D_1 = 4,11$
% parasitemia pada $D_2 = 7,79$
% pertumbuhan parasit = $7,79 - 4,41 = 3,68$
 - ❖ % parasitemia pada $D_2 = 7,79$
% parasitemia pada $D_3 = 10,97$
% pertumbuhan parasit = $10,97 - 7,79 = 3,18$
 - ❖ % parasitemia pada $D_3 = 10,97$
% parasitemia pada $D_4 = 14,40$
% pertumbuhan parasit = $14,40 - 10,97 = 3,43$
- % pertumbuhan parasit Replikasi 2 = $\frac{3,30 + 3,68 + 3,18 + 3,43}{4} = 3,40$

Replikasi 3

- ❖ % parasitemia pada $D_0 = 0,94$
% parasitemia pada $D_1 = 5,33$
% pertumbuhan parasit = $5,33 - 0,94 = 4,39$
 - ❖ % parasitemia pada $D_1 = 5,33$
% parasitemia pada $D_2 = 10,59$
% pertumbuhan parasit = $10,59 - 5,33 = 5,26$
 - ❖ % parasitemia pada $D_2 = 10,59$
% parasitemia pada $D_3 = 15,13$
% pertumbuhan parasit = $15,13 - 10,59 = 4,54$
 - ❖ % parasitemia pada $D_3 = 15,13$
% parasitemia pada $D_4 = 17,38$
% pertumbuhan parasit = $17,38 - 15,13 = 2,25$
- % pertumbuhan parasit Replikasi 3 = $\frac{4,39 + 5,26 + 4,54 + 2,25}{4} = 4,11$

Lampiran 6

Persen Penghambatan

Untuk menghitung persen penghambatan larutan uji terhadap pertumbuhan *P. berghei* digunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \left\{ \frac{X_e}{X_k} \times 100 \% \right\}$$

Keterangan :

X_e : persen pertumbuhan parasit rata-rata pada tiap dosis bahan uji

X_k : persen pertumbuhan parasit rata-rata pada kontrol negatif

Contoh perhitungan prosen penghambatan :

% pertumbuhan parasit rata-rata pada bahan uji = 0,95

% pertumbuhan parasit rata-rata pada kontrol negatif = 3,63

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \left\{ \frac{0,95}{3,63} \times 100 \% \right\} = 73,83 \%$$

Lampiran 7
Hasil Analisis Probit Fraksi Metanol (F II M)
Dari Kulit Batang *Artocarpus champeden* Spreng.

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

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
 10 cases rejected because of missing data.
 0 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

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

Parameter estimates converged after 7 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
Dosis	.23878	.04131	5.78005
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.42569	.07245	5.87573

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = .393 DF = 3 P = .942

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no 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

Number of Observed Expected

Prob	Dosis	Subjects	Responses	Responses	Residual
.74680	1.00	100.0	74.4	74.680	-.300
.66483	.00	100.0	68.3	66.483	1.837
.57413	-1.00	100.0	55.9	57.413	-1.493
.47932	-2.00	100.0	46.6	47.932	-1.372
.38566	-3.00	100.0	39.9	38.566	1.294

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective Dosis

Prob	Dosis	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	2.98179E-012	1.19163E-017	1.42777E-009
.02	4.13163E-011	6.30582E-016	.00000
.03	2.19007E-010	7.81257E-015	.00000
.04	7.67979E-010	5.18458E-014	.00000
.05	2.13096E-009	2.41556E-013	.00000
.06	5.07962E-009	8.94604E-013	.00000
.07	.00000	2.81838E-012	.00000
.08	.00000	7.87140E-012	.00000
.09	.00000	2.00242E-011	.00000
.10	.00000	4.72788E-011	.00000
.15	.00000	1.64967E-009	.00002
.20	.00000	.00000	.00007
.25	.00002	.00000	.00024
.30	.00010	.00000	.00074
.35	.00040	.00002	.00212
.40	.00143	.00012	.00591
.45	.00491	.00069	.01666
.50	.01649	.00356	.04972
.55	.05540	.01626	.16832
.60	.18978	.06364	.69512
.65	.67756	.21829	3.59525
.70	2.59069	.70544	13.04626
.75	11.01513	2.31716	184.75323
.80	55.19970	8.31056	1966.50488
.85	361.25204	35.67117	31971.51413
.90	3840.30425	217.53769	1094992.99125
.91	6796.88394	335.80290	2577384.06531
.92	12637.68636	537.73346	6537409.28349
.93	24994.29090	901.66159	18206962.4713
.94	53532.79729	1604.59333	57204294.1794
.95	127607.22379	3093.43017	211297952.796
.96	354080.25563	6681.80031	981904453.897
.97	1241639.25752	17198.42970	6499099014.45
.98	6581568.06619	60329.84350	80297104967.5
.99	91195683.2961	434776.60579	4235618650053

Probit Transformed Responses

