

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



LAPORAN AKHIR
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PERGURUAN TINGGI
PROYEK DP3M TAHUN ANGGARAN 2008

**EKSTRAK TERSTANDAR KULIT BATANG CEMPEDAK
(*ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG.) SEBAGAI BAHAN
BAKU OBAT FITOFARMAKA ANTIMALARIA POTENSIAL**

Ketua Peneliti

Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi., Apt.

Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Nomor Kontrak : 319/SP2H/PP/DP2M/III2008
Tanggal : 5 Maret 2008



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

KKB
KK-2
LP-182/110
x/d
e

LAPORAN AKHIR
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PERGURUAN TINGGI
PROYEK DP3M TAHUN ANGGARAN 2008

**EKSTRAK TERSTANDAR KULIT BATANG CEMPEDAK
(ARTOCARPUS CHAMPEDEN SPRENG.) SEBAGAI BAHAN
BAKU OBAT FITOFARMAKA ANTIMALARIA POTENSIAL**

Ketua Peneliti

Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi., Apt.

Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Nomor Kontrak : 319/SP2H/PP/DP2M/III2008
Tanggal : 5 Maret 2008



**LAPORAN AKHIR
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PERGURUAN TINGGI
PROYEK DP3M TAHUN ANGGARAN 2007**

**EKSTRAK TERSTANDAR KULIT BATANG CEMPEDAK
(*ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG.) SEBAGAI BAHAN
BAKU OBAT FITOFARMAKA ANTIMALARIA POTENSIAL**

Peneliti :

**Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi., Apt.
Dr. Achmad Fuad hafid, MS.Apt.
Dra. Wiwied Ekasari, Msi, Apt.
dr. Sjafruddin, Ph.D
Prof. Dr. Noor Cholies Zaini.**

LEMBAR PENGESAHAN USUL PENELITIAN FUNDAMENTAL

1. Judul Penelitian : EKSTRAK TERSTANDAR KULIT BATANG
CEMPEDAK (*ARTOCARPUS CHAMPEDEN
SPRENG.*) SEBAGAI BAHAN BAKU OBAT
FITOFARMAKA ANTIMALARIA POTENSIAL
2. Ketua Peneliti :
- a. Nama Lengkap : Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi,Apt.
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 131877884
 - d. Golongan /Pangkat : IIIId/Penata
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor
 - f. Fakultas /Jurusan : Farmasi
 - g. Alamat : Jl. Darmawangsa Dalam, Surabaya
 - h. Pusat Penelitian /Lab : Departemen Farmakognosi-fitokimia
 - i. Telepon / Fax / E-mail : (031)-5033710
 - j. Alamat Rumah : Griya Babatan Mukti, Blok P-6, Surabaya
 - k. Telepon / Fax. : (031)-7530806
3. Jangka Waktu : 2 tahun
4. Pembiayaan
- a. Usul Biaya Tahun Pertama : Rp. 50.000.000,-
 - b. Usul Biaya Tahun Kedua : Rp. 50.000.000,-
 - c. Biaya dari Instansi lain : -

Surabaya, 09 Pebruari 2009

Mengetahui
Dekan Fakultas Farmasi Unair

Ketua Peneliti,

Prof. Dr. Achmad Syachrani
NIP : 130 809 077

Dr. Aty Widyawaruyanti,Apt.,MSi.
NIP: 131 877 884

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh.
NIP. 131 837 004

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan segala rangkaian penelitian ini sampai pada penyelesaian laporan akhir. Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. DP2M Ditjen Dikti Depdiknas, yang mempercayakan pelaksanaan penelitian ini kepada kami sekaligus mendanai.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan yang seluas-luasnya untuk dilakukannya penelitian ini.
3. Kepala Laboratorium Hewan Coba Universitas Airlangga yang sangat berperan pada fasilitas laboratorium dan hewan coba.
4. Ketua Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Unair yang telah membantu fasilitas laboratorium dalam pelaksanaan penelitian ini .
5. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu yang sangat berperan dalam pelaksanaan penelitian ini.

Rasa terima kasih ini menyertai doa kami kepada Alloh SWT, semoga budi baik dan jerih payah selama ini memperoleh manfaat yang sebanyak-banyaknya baik bagi diri sendiri maupun bagi keluarga dan Universitas Airlangga serta masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Pebruari 2009

Penulis

RINGKASAN HASIL PENELITIAN

Resistensi parasit terhadap obat antimalaria utama, klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin sampai saat ini masih merupakan hambatan utama dalam upaya penanggulangan malaria di dunia dan mendesak dilakukannya upaya-upaya untuk menemukan obat antimalaria baru dengan target yang berbeda dengan obat-obatan tersebut. Berbagai obat-obatan tradisional yang berasal dari tanaman atau bahan alam telah banyak digunakan di berbagai negara oleh etnik tertentu dan sangat potensial untuk diteliti lebih lanjut untuk mengungkap senyawa bioaktif yang mungkin terdapat di dalamnya.

Tumbuhan *Artocarpus champeden* (suku Moraceae) atau dikenal dengan nama daerah cempedak, banyak ditemukan di Indonesia dan telah digunakan dalam ramuan obat tradisional, sebagai obat malaria.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa senyawa stilbene terprenilasi dari *Artocarpus integer* (nama lain dari cempedak) mempunyai aktivitas antimalaria *in vitro* pada *Plasmodium falciparum*. Sedangkan penelitian kami terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak dari tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria baik *in vivo* maupun *in vitro*. Aktivitas antimalaria juga ditunjukkan dari beberapa isolat yang diperoleh dari tanaman ini. Salah satu isolat tersebut, yang teridentifikasi sebagai senyawa heteroflavanon C, suatu flavon terprenilasi, menunjukkan aktivitas antimalaria yang sangat poten, lebih poten dibandingkan obat malaria standar klorokuin.

Mengingat aktivitasnya yang sangat poten dalam menghambat pertumbuhan parasit malaria, maka tanaman cempedak ini sangat prospektif untuk dikembangkan sebagai bahan obat antimalaria.

Permasalahannya, selama ini pemanfaatan kulit batang cempedak secara tradisional oleh masyarakat dalam mengobati penyakit malaria selama ini, tidak dapat menjamin kejelasan khasiat, keamanan dan efektifitasnya. Sehingga sulit dipertanggung jawabkan secara medis. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemanfaatan tanaman ini sebagai produk fitofarmakanya yang menggunakan pendekatan multikomponen, bukan strategi penemuan zat tunggal seperti pada obat modern. Dalam pengembangannya sebagai obat fitofarmaka, penting sekali dilakukan standarisasi terhadap bahan baku obat yang akan digunakan. Standarisasi suatu bahan baku obat adalah serangkaian prosedur dan cara pengukuran yang parameter hasilnya

merupakan unsur-unsur yang terkait dengan konsep mutu kefarmasian, dalam artian memenuhi standar kimia dan biologis sekaligus jaminan stabilitas produk kefarmasian umumnya.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian untuk mendapatkan bahan obat fitofarmaka antimalaria dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng) dalam bentuk ekstrak terstandar yang mempunyai keajegan kandungan kimianya. Sehingga dapat dijamin keajegan khasiat, keamanan dan efektifitasnya.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan penelitian, dimulai dari ekstraksi dan standarisasi ekstrak kulit batang cempedak. Standarisasi dimulai dari pemeriksaan mikroskopis simplisia kulit batang cempedak yang akan digunakan, penetapan kadar senyawa marker serta profil kromatogram dengan KLT densitometri. Kemudian akan dilakukan pula pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* dan *in vitro* terhadap ekstrak terstandar, serta uji toksisitas dan keamanannya.

Pada tahun I telah dilakukan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Penyiapan dan pemeriksaan simplisia kulit batang cempedak secara mikroskopis.
2. Ekstraksi kulit batang cempedak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol.
3. Fraksinasi ekstrak etanol dengan pelarut etil asetat dan n-butanol.
4. Uji antimalaria *in vitro* dan *in vivo* terhadap ekstrak, fraksi dan isolat yang diperoleh.

Telah diperoleh ciri mikroskopis dari simplisia kulit batang cempedak sebagai identitas dari tanaman cempedak (*A. champeden*).

Telah diperoleh ekstrak etanol (EEt), fraksi etil asetat (FEa) dan fraksi butanol (FB) yang pada identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid.

Terhadap ekstrak etanol (EEt), fraksi etil asetat (FEa) dan fraksi butanol (FB) telah dilakukan uji antimalaria baik *in vivo* terhadap *Plasmodium berghei*, maupun *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum*. Dari hasil uji antimalaria *in vivo* diketahui bahwa ekstrak etanol mempunyai aktivitas yang lebih poten dibandingkan fraksi etil asetat maupun fraksi butanol. Ekstrak etanol 80% dari kulit batang cempedak dapat menghambat pertumbuhan parasit *P. berghei in vivo* pada mencit sebesar 76,70% pada dosis 100 mg/kg BB mencit dengan nilai ED₅₀ sebesar 0,2447 mg/kg BB mencit untuk perlakuan selama 4 hari, dan dapat menghambat pertumbuhan *P.falciparum in*

vitro dengan nilai $IC_{50} = 1,8983 \mu\text{g/mL}$. Oleh karena itu ekstrak etanol kulit batang cempedak ini dapat dinyatakan sebagai ekstrak aktif.

Terhadap ekstrak aktif ini dilakukan identifikasi dengan KLT-densitometri sebagai langkah awal untuk isolasi terhadap senyawa marker. Dari hasil identifikasi ini diketahui adanya spot berwarna oranye intensif pada R_f 0,42, yang merupakan senyawa flavonoid dan dapat dijadikan sebagai marker dari ekstrak etanol kulit batang cempedak.

Selanjutnya terhadap ekstrak etanol dilakukan fraksinasi menggunakan metode KLT preparatif dengan fase gerak pelarut Metanol : Air (4/1 v/v) dan fase diam RP-18. Dari hasil fraksinasi ini diperoleh 6 fraksi utama (F1-F6). Hasil identifikasi dengan KLT menunjukkan bahwa spot oranye pada R_f 0,42 terdapat pada fraksi F3.

Pada uji aktifitas antimalaria *in vitro* terhadap ke 6 fraksi ini diketahui bahwa F3 merupakan fraksi aktif. Hasil identifikasi dengan KLT dan KLT-densitometri menggunakan pelarut Kloroform : Metanol (9,5/0,5 v/v) dan fase diam silika gel diketahui bahwa spot oranye pada R_f 0,13 merupakan senyawa flavonoid.

Sedangkan, pada tahun II telah dilakukan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Fraksinasi ekstrak etanol dan isolasi senyawa aktif dengan metode kromatografi kolom, pemurnian dan identifikasi isolat
2. Penetapan parameter standar non spesifik simplisia dan ekstrak etanol kulit batang cempedak
3. Penetapan parameter standar spesifik dengan parameter penentuan kadar marker menggunakan KCKT
4. Pengujian keamanan penggunaan ekstrak etanol pada hewan coba mencit

Berdasarkan hasil identifikasi isolat menggunakan KLT-Densitometri, Spektrometer UV-Vis dan KCKT diketahui bahwa isolat (senyawa marker) dari ekstrak etanol kulit batang cempedak merupakan golongan chalcon.

Nilai parameter standar non spesifik simplisia kulit batang cempedak yaitu kadar abu sebesar $8,644 \% \pm 0,16$ dan susut pengeringan $9,07 \% \pm 0,19$. Nilai parameter standar non spesifik ekstrak etanol kulit batang cempedak yaitu kadar abu total sebesar $3,2 \% \pm 0,2 \%$, kadar abu tidak larut asam $0,45 \% \pm 0,03\%$, kadar air $15,65 \% \pm 0,58\%$, susut pengeringan $12,6 \% \pm 0,86\%$, cemaran logam berat memenuhi ketentuan WHO yaitu Pb $0,138 \text{ mg/kg}$, Cd $0,139 \text{ mg/kg}$, dan Cu $0,595 \text{ mg/kg}$.

Berdasarkan hasil optimasi pengembangan metode analisis penentuan kadar marker golongan chalcon dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak, diketahui bahwa analisis penentuan kadar senyawa marker dalam Eet dapat dilakukan dengan menggunakan KCKT Agilent 1100, kolom Microsorb RP18, suhu kolom 30°C, kecepatan alir 1 ml/menit, fase gerak metanol-air (65:35 v/v). Pada kondisi KCKT tersebut, diperoleh nilai resolusi sebesar 1,4, *purity factor* 995,966, *match factor* 981,261, koefisien korelasi, *r*, 0,999, batas deteksi 0,01 ppm, batas kuantitasi 0,03 ppm, nilai rekoverti 98,599%, KV pada presisi alat 6,7065 % dan pada presisi metode 8,84%. Oleh karena itu kondisi KCKT tersebut dapat dianggap sebagai kondisi optimal untuk analisis penentuan kadar marker dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak. Selanjutnya, diperoleh kadar marker dalam ekstrak sebesar 0,337 % b/b.

Pengujian keamanan penggunaan ekstrak etanol 80% dilakukan melalui uji toksisitas akut dan subakut. Hasil uji toksisitas akut dan subakut, menunjukkan bahwa pemberian oral ekstrak etanol 80% kulit batang cempedak pada hewan coba mencit relatif tidak toksik dan tidak ada pengaruh peningkatan SGOT dan SGPT serum hewan coba setelah pemberian oral ekstrak etanol cempedak. Berdasarkan gambaran histopatologi hati, pemberian ekstrak etanol 80% kulit batang cempedak dengan dosis lazim 1,9017 mg/20 g BB mencit selama 30 hari dapat menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histologi berupa degenerasi dan nekrosis.

SUMMARY

Parasite resistance to antimalarial drug, chloroquine and sulfadoxin-pirimetamin, still become major problem in malaria control worldwide, therefore, effort to develop new and different target antimalarial drugs is put in high priority. Several plants are used in traditional medicine for the treatment of malaria in many parts of world and very potential to further investigation of bioactive compounds from plant sources.

Artocarpus champeden (family Moraceae) known as "cempedak", is widely distributed in Indonesia and has been traditionally used for malarial remedies. Previous study reported that prenylated stilbene from *Artocarpus integer* (syn *Artocarpus champeden*) exhibit antimalarial activities againts *Plasmodium falciparum*. Our preliminary test revealed that extract from *Artocarpus champeden* exhibit potent antimalarial activities againts *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. Several isolated compounds from this plant exhibit antimalarial activities. One of the isolated compound identified as heteroflavon C, a prenylated flavone, have an antimalarial activities higher than chloroquine.

Artocarpus champeden exhibit potent antimalarial activities, therefore, it is potential to be developed as antimalarial drugs. The traditionally used of *Artocarpus champeden* stembark become a problem to ensure the consistency of its efficacy, safety and effectivity. Therefore, the development of *Artocarpus champeden* stembark through phytopharmaceutical product with multicomponent approach, not single component strategy as modern drugs, is very important. The development of phytopharmaceutical product require standardization of plant material. Standardization is a set of procedure and analysis method, that the result parameter is connected to pharmaceutical quality concept, fulfill chemical and biological standart and ensure the stability of product.

The present study aims to develop plant material of antimalarial phytopharmaceutical from standarized *Artocarpus champeden* stembark extract with consistent chemical composition, and ensured consistency of its efficacy, safety and effectivity.

This study include several steps, start from extraction and standarization of *Artocarpus champeden*. Standarization include microscopic analysis of *Artocarpus*

champeden, quantitative analysis of marker compound and chromatogram profile through TLC-Densitometry. Further steps to determine the antimalarial activities of standardized extract against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*, toxicity test and its safety.

Work has been conducted in year I include following steps :

1. Preparation and microscopic analysis of *Artocarpus champeden*
2. Extraction of *Artocarpus champeden* stem bark through maceration using ethanol.
3. Fractionation of ethanol extract using ethylacetate and butanol.
4. Antimalarial activities test against *Plasmodium berghei in vivo* of extract, fraction and isolated compound.

Extraction and fractionation *Artocarpus champeden* stem bark yielded ethanol extract, ethylacetate and butanol fraction. Identification of ethanol extract, ethylacetate fraction and butanol fraction by TLC showed that both extract and fraction consist of flavonoid compound.

The antimalarial activities of ethanol extract (EEt), ethylacetate fraction (FEa) and butanol fraction (FB) against *Plasmodium berghei in vivo* and against *Plasmodium falciparum in vitro*, klon 3D7 was done. The assay showed that ethanol extract have antimalarial activities higher than ethylacetate fraction and butanol fraction, so that ethanol extract can be mentioned as active extract.

Identification of active extract through TLC-Densitometry as preliminary step of marker compound isolation yielded intensive orange spot Rf 0,42 and identified as flavonoid compound that can be used as marker.

TLC-Preparatif fractionation of ethanol extract using mobile phase methanol : water (4/1 v/v) and stationary phase RP-18, yielded 6 major fraction (F1-F6) and orange spot Rf 0,42 present in F3. From antimalarial activities test against *Plasmodium falciparum in vitro* known that F3 is active fraction. Identification of F3 through TLC-Densitometry using mobile phase chloroform : methanol (9,5/0,5 v/v) dan stationary phase silica gel identified orange spot Rf 0,13 as flavonoid compound.

Work in progress in year II include following steps :

1. Fractionation of ethanol extract and isolation of active compound using column chromatography, purification and identification of isolated compound
2. Determination of non specific standard parameter of *A. champeden* stem bark and ethanol extract of *A. champeden* stem bark

3. Determination of specific standard parameter by quantification of marker content in ethanol extract of *A. champeden* stembark by using HPLC
4. Preclinical toxicity test in mice after oral administration of ethanol extract of *Artocarpus champeden* stembark

Identification of isolated compound using TLC-Densitometri, Spektrometer UV-Vis and HPLC show that isolated compound (marker) from ethanol extract of *Artocarpus champeden* stembark is chalcone.

Results for non specific standard parameter of *A. champeden* stembark including total ash content was $8.644\% \pm 0.16$ and lost on drying was $9.07\% \pm 0.19$. Results for specific standard parameter of ethanol extract of *A. champeden* stembark including total ash content was $3.2\% \pm 0.2\%$, acid insoluble ash content $0.45\% \pm 0.03\%$, water content $15.65\% \pm 0.58\%$, lost on drying $12.6\% \pm 0.86\%$, metal contamination meet the WHO criteria with Pb, Cd and Cu contamination were 0.138 mg/kg, 0.139 mg/kg and 0.595 mg/kg.

Optimization of analysis method development for quantification marker in ethanol extract of *A. champeden* stembark using HPLC showed that this method is valid and can be applied to quantify marker content in ethanol extract of *A. champeden* stembark with following conditions: Microsorb RP18 column, column temperature 30°C , flow rate 1 ml/minute and mobile phase methanol-water (65:35 v/v). Method validation using this conditions yielded resolution value of 1.4, *purity factor* 995.966, *match factor* 981.261, correlation coefficient, r , 0.999, detection limit 0.01 ppm, quantitation limit 0.03 ppm, recovery value 98.599%, RSD 6.7065 % on instrument precision and RSD 8,84% on method precision. By using this valid method, marker content in extract was 0.337 % w/w.

Preclinical toxicity test in mice after oral administration ethanol extract of *Artocarpus champeden* stembark was carried out. Acute toxicity test was conducted using the highest dose of 21 g/kgBW/day. Subacute toxicity test was expressed by level of ALT and AST activities in serum. The result showed that the ethanol extract was relatively safe. In addition, there was no significantly difference of ALT and AST activities in serum observed. Histopathological changes due to degeneration and necrosis were observed after 30 days oral administration of ethanol extract of *A. champeden* stembark using dose 1,9017 mg/20 g BW/day.

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Lembar Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Ringkasan	v
Summary	ix
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xiv
Daftar Gambar	xvi
Daftar Lampiran	xviii
BAB I Pendahuluan	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
BAB II Tinjauan Pustaka	
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman Cempedak (<i>Artocarpus champeden</i> Spreng.)	
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	6
2.1.2 Deskripsi Tanaman	6
2.1.3 Kandungan Kimia	8
2.1.4 Bioaktivitas <i>Artocarpus champeden</i> Spreng	10
2.2 Senyawa Flavonoid dan Aktivitasnya Sebagai Antimalaria	11
2.3 Penyakit malaria dan situasi global penyakit malaria	13
2.4 Parasit Resistensi Obat Malaria	
2.4.1 Obat antimalaria	16
2.4.2 Kasus Resistensi obat antimalaria	17
2.5 Studi pendahuluan yang telah dilakukan	19
BAB III Tujuan dan Manfaat Penelitian	
3.1 Tujuan Penelitian	21
3.2 Manfaat Penelitian	22
BAB IV Metode Penelitian	
4.1 Bahan Penelitian	
4.1.1 Bahan Tanaman	23
4.1.2 Hewan Coba	23
4.1.3 Suspensi Parasit	23
4.1.4 Bahan Kimia.....	24
4.2 Alat-alat Penelitian	24
4.3 Lokasi Penelitian	25
4.4 Cara Kerja	
4.4.1 Ekstraksi kulit batang cempedak (<i>Artocarpus champeden</i>)	25
4.4.2 Isolasi Senyawa Marker	26
4.4.3 Penetapan Parameter Standar Nonspesifik Simplisia Cempedak	27
4.4.4 Penetapan Parameter Standar Nonspesifik Ekstrak Etanol Cempedak	28
4.4.5 Penetapan standar ekstrak etanol cempedak terhadap parameter kadar marker	31
4.4.6 Penentuan Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Kulit	

	Batang Cempedak <i>in vivo</i> pada mencit	36
	4.4.7 Penentuan Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Kulit Batang Cempedak secara <i>in vitro</i>	39
	4.4.8 Uji Toksisitas	40
BAB V	Hasil dan Pembahasan	
	5.1 Hasil Penentuan Senyawa Marker	46
	5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi	46
	5.1.2 Hasil Identifikasi ekstrak etanol, fraksi etilasetat dan fraksi butanol dengan KLT	46
	5.1.3 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria <i>in vivo</i> Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang Cempedak	48
	5.1.4 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria <i>in vitro</i> Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang Cempedak	50
	5.1.5 Hasil Penentuan Senyawa Marker Pada Ekstrak Aktif (ekstrak etanol)	52
	5.2 Hasil Isolasi Senyawa Marker	
	5.2.1 Hasil Ekstraksi	57
	5.2.2 Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol	57
	5.2.3 Hasil Subfraksinasi	58
	5.2.4 Hasil Pemurnian Subfraksi	59
	5.2.5 Identifikasi marker	60
	5.3 Penetapan Parameter Non Spesifik Simplisia	
	5.3.1 Uji Makroskopik Simplisia	64
	5.3.2 Identifikasi serbuk	64
	5.3.3 Penetapan Kadar Abu	66
	5.3.4 Penetapan Susut Pengerangan	68
	5.4 Penetapan Parameter non spesifik Ekstrak Etanol 80%	
	5.4.1 Penetapan Kadar Abu	68
	5.4.2 Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam	69
	5.4.3 Penetapan kadar air	70
	5.4.4 Penetapan susut pengeringan	70
	5.4.5 Penetapan kadar cemaran logam berat	71
	5.5 Penetapan Standar Ekstrak Aktif terhadap Parameter Kadar Senyawa Marker	
	5.5.1 Validasi Metode	72
	5.5.2 Penetapan kadar senyawa marker dalam Ekstrak Etanol kulit batang cempedak	81
	5.5.3 Profil kromatogram KCKT	82
	5.6 Uji Toksisitas dan Keamanannya pada Hewan Coba	
	5.6.1 Pengujian Toksisitas Akut	83
	5.6.2 Uji Toksisitas Subakut	84
BAB VI	Kesimpulan dan Saran	
	6.1 Kesimpulan	90
	6.2 Saran	91
Daftar Pustaka	92
Lampiran	96

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Skor perubahan gambaran histopatologi hati mencit	44
Tabel 5.1	Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium berghei</i>	49
Tabel 5.2	Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan fraksi etil asetat kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium berghei</i>	49
Tabel 5.3	Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan fraksi butanol kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium berghei</i>	49
Tabel 5.4	Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium falciparum</i>	50
Tabel 5.5	Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan fraksi etil asetat kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium falciparum</i>	51
Tabel 5.6	Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan fraksi butanol kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium falciparum</i> ..	51
Tabel 5.7	Hasil analisis probit aktivitas antimalaria ekstrak dan fraksi kulit batang cempedak secara <i>in vitro</i>	52
Tabel 5.8	Persen parasitemia dan persen penghambatan fraksi F3 ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium falciparum</i>	56
Tabel 5.9	Hasil pengamatan mikroskopis batang cempedak.....	66
Tabel 5.10	Penimbangan krus pada penetapan kadar abu	66
Tabel 5.11	Penimbangan simplisia kulit batang cempedak pada penetapan kadar abu	67
Tabel 5.12	Penimbangan krus dan simplisia pada penetapan susut pengeringan simplisia serbuk kulit batang cempedak	68
Tabel 5.13	Hasil Penetapan Kadar Abu	68
Tabel 5.14	Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam	69
Tabel 5.15	Penetapan Kadar Air	70
Tabel 5.16	Penimbangan Krus Porselen dan Berat Ekstrak Awal	70
Tabel 5.17	Penimbangan Ekstrak yang Dipijar	70
Tabel 5.18	Penetapan Susut Pengeringan Ekstrak	71
Tabel 5.19	Penetapan Kadar Logam Berat	71
Tabel 5.20	Tabel konsentrasi larutan standar yang diinjekkan pada HPLC (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)	76
Tabel 5.21	Hasil penentuan LOD dan LOQ pada penetapan kadar senyawa marker dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak	77
Tabel 5.22	Tabel konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak yang diinjekkan pada HPLC (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)	79
Tabel 5.23	Hasil pengukuran akurasi pada penetapan kadar senyawa marker dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak	79
Tabel 5.24	Tabel konsentrasi larutan standar yang diinjekkan pada HPLC (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)	80
Tabel 5.25	Tabel konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak yang diinjekkan pada HPLC (ppm) dengan luas area yang diperoleh	

	(mAU)	81
Tabel 5.26	Tabel konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak yang diinjeksikan pada HPLC (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)	82
Tabel 5.27	Hasil uji toksisitas akut sediaan suspensi dari sediaan ekstrak cempedak pada mencit	83
Tabel 5.28	Hasil Pemeriksaan Kadar SGOT dan SGPT pada Mencit	84
Tabel 5.29	Harga Rerata Kadar SGOT Hewan Coba Tiap Kelompok	85
Tabel 5.30	Ringkasan ANAVA Kadar SGOT Hewan Coba	85
Tabel 5.31	Harga Rerata Kadar SGPT Hewan Coba Tiap Kelompok	85
Tabel 5.32	Ringkasan ANAVA Kadar SGOT Hewan Coba	86
Tabel 5.33	Nilai skor perubahan gambaran histologi mencit pada seluruh kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa degenerasi pada uji ekstrak etanol	87
Tabel 5.34	Nilai skor perubahan gambaran histologi mencit pada seluruh kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa nekrosis pada uji ekstrak etanol	87

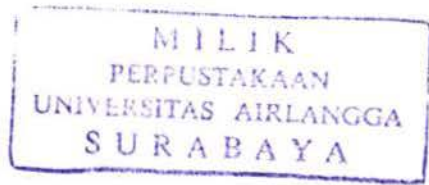
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Foto tanaman cempedak (<i>Artocarpus champeden</i>)	8
Gambar 2.2	Jenis-jenis flavonoid dari <i>A. champeden</i> Spreng.	10
Gambar 2.3	Hubungan biogenetik senyawa-senyawa flavonoid	13
Gambar 4.1	Skema Operasional Penelitian	42
Gambar 5.1	Kromatogram hasil KLT dari ekstrak etanol (1), fraksi etil asetat (2) dan fraksi butanol (3), fase gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam <i>reverse phase</i> RP-18, dilihat di bawah lampu uv 254 nm (a), 365 nm (b) dan dengan penampak noda H_2SO_4 10% (c).....	47
Gambar 5.2	Kromatogram hasil KLT dari ekstrak etanol, fase gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam <i>reverse phase</i> RP-18, penampak noda H_2SO_4 10%; dan spektrum serapan beberapa spot pada panjang gelombang 365 nm secara densitometri.....	52
Gambar 5.3	Kromatogram hasil KLT preparatif dari ekstrak etanol (EtOH) ekstrak etanol, (1) fraksi F1, (2) fraksi F2, (3) fraksi F3, (4) fraksi F4, (5) fraksi F5, (6) fraksi F6, (A) : fase gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam <i>reverse phase</i> RP-18, (B) : fase gerak $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 5%, fase diam silika gel; penampak noda H_2SO_4 10%.....	53
Gambar 5.4	Kromatogram KLT dan spektrum serapan densitometri fraksi F3, fase gerak $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 5% dan fase diam silika gel	54
Gambar 5.5	Identifikasi spektrum serapan densitometri fraksi F3 spot 2 (A) dengan berbagai senyawa flavonoid (B) yang dikutip dari Markham (1985)	55
Gambar 5.6	Kromatogram hasil KLT ekstrak etanol dengan fase diam RP-18, fase gerak $\text{MeOH}:\text{air}$ (4:1 v/v), dan penampak noda H_2SO_4	57
Gambar 5.7	Kromatogram hasil KLT dari fraksi 1-10 hasil pemisahan ekstrak etanol. Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak kloroform:metanol (9:1 v/v), dan penampak noda H_2SO_4 10%	58
Gambar 5.8	Kromatogram hasil KLT subfraksi 1-10 hasil pemisahan fraksi 4. Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak kloroform:metanol (9:1 v/v), dan penampak noda H_2SO_4 10%	59
Gambar 5.9	Kromatogram hasil KLT ekstrak etanol (Eet), fraksi 4 (F4), subfraksi 1 (SF1) dan isolat (I). Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak kloroform:metanol (9:1 v/v), dan penampak noda H_2SO_4 10%.....	59
Gambar 5.10	Skema isolasi marker ekstrak etanol <i>Artocarpus champeden</i>	60
Gambar 5.11	Spektrum serapan isolat secara KLT densitometri.	61
Gambar 5.12	Spektrum uv vis isolat kulit batang <i>A. champeden</i>	61
Gambar 5.13	Profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang <i>Artocarpus champeden</i> dengan KCKT	62
Gambar 5.14	Spektrum serapan puncak dengan R_t 13,159 menit pada kromatogram ekstrak etanol	62
Gambar 5.15	Spektrum serapan puncak dengan R_t 12,055 menit pada kromatogram subfraksi 1	63
Gambar 5.16	Profil kromatogram isolat hasil purifikasi subfraksi 1 dengan	

	KCKT	63
Gambar 5.17	Irisan kulit batang cempedak	64
Gambar 5.18	Mikroskopis serbuk kulit batang	65
Gambar 5.19	Irisan melintang batang cempedak	65
Gambar 5.20	Profil kromatogram hasil KCKT ekstrak etanol (Eet) dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18	73
Gambar 5.21	Profil kemurnian puncak dengan waktu retensi 13,092 menit dari kromatogram ekstrak etanol (Eet) yang dielusi dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18	73
Gambar 5.22	Profil kromatogram hasil KCKT senyawa marker dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18	74
Gambar 5.23	Profil kemurnian puncak dengan waktu retensi 12,360 menit dari kromatogram senyawa marker yang dielusi dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18	74
Gambar 5.24	Profil spektrum puncak senyawa yang dianalisis pada ekstrak dan senyawa marker dengan waktu retensi 12-13 menit setelah dielusi dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18	75
Gambar 5.25	Kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU)	76
Gambar 5.26	Kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU)	77
Gambar 5.27	Profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang cempedak dengan konsentrasi 10.000 ppm yang dianalisis dengan KCKT Agilent 1100	78
Gambar 5.28	Gambar 5.28 Profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang cempedak yang ditambahkan standar dan dianalisis dengan KCKT Agilent 1100	78
Gambar 5.29	Profil kromatogram hasil KCKT ekstrak etanol (Eet) dengan eluen metanol-air (55:45) kolom Microsorb RP-18	82
Gambar 5.30	Gambaran mikroskopis Sel Hati Mencit pada Kelompok Dosis I dengan Pewarnaan HE dan Perbesaran 400x yang tampak mengalami perubahan histopatologi berupa degenerasi (→) sel akibat pemberian Ekstrak Etanol Kulitang Cempedak Dosis Lazim (skor 2)	88
Gambar 5.31	Gambaran Mikroskopis Sel Hati Mencit pada kelompok Dosis 2 dengan Pewarnaan HE dan perbesaran 400x yang tampak mengalami perubahan histopatologi berupa degenerasi (→) sel akibat pemberian Ekstrak Etanol Kulit Batang Cempedak 5x Dosis Lazim (skor 2)	88
Gambar 5.32	Gambaran Mikroskopis Sel Hati Mencit pada kelompok dosis 3 dengan Pewarnaan HE dan Perbesaran 400x yang tampak mengalami Perubahan Histopatologi berupa degenerasi (→) sel (skor 3) dan nekrosis (↑) sel (skor2) akibat pemberian Ekstrak Etanol Kulit Batang Cempedak 10x Dosis Lazim	89

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Ringkasan persen penghambatan fraksi F1-F6 ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap <i>Plasmodium falciparum</i> dan hasil analisis probit	96
Lampiran 2	Hasil Analisis ANAVA Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Cempedak	97
Lampiran 3	Data uji toksisitas subakut dengan parameter histopatologi hati	99
Lampiran 4	Hasil analisis data histopatologi hati dengan Kruskal-wallis test	103
Lampiran 5	Hasil analisis data histopatologi hati dengan Kruskal-wallis test	104



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi parasit terhadap obat antimalaria utama, klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin sampai saat ini masih merupakan hambatan utama dalam upaya penanggulangan malaria di dunia dan mendesak dilakukannya upaya-upaya untuk menemukan obat antimalaria baru dengan target yang berbeda dengan obat-obatan tersebut. Berbagai obat-obatan tradisional yang berasal dari tanaman atau bahan alam telah banyak digunakan di berbagai negara oleh etnik tertentu dan sangat potensial untuk diteliti lebih lanjut untuk mengungkap senyawa bioaktif yang mungkin terdapat di dalamnya.

Tumbuhan *Artocarpus champeden* (suku Moraceae) atau dikenal dengan nama daerah cempedak, banyak ditemukan di Indonesia dan telah digunakan dalam ramuan obat tradisional, sebagai obat malaria.

Penelitian Boonlaksiri *et al*, (2000) melaporkan bahwa senyawa stilbene terprenilasi dari *Artocarpus integer* (nama lain dari cempedak) mempunyai aktivitas antimalaria *in vitro* pada *Plasmodium falciparum*. Sedangkan penelitian kami terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak dari tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria baik *in vivo* maupun *in vitro* (Utomo, 2003; Hidayati, 2003; Zaini *et al*, 2005). Aktivitas antimalaria juga ditunjukkan dari beberapa isolat yang diperoleh dari tanaman ini. Salah satu isolat tersebut, yang teridentifikasi sebagai senyawa heteroflavanon C, suatu flavon terprenilasi, menunjukkan

aktivitas antimalaria yang sangat poten, lebih poten dibandingkan obat malaria standar klorokuin (Widyawaruyanti, 2006).

Mengingat aktivitasnya yang sangat poten dalam menghambat pertumbuhan parasit malaria, maka tanaman cempedak ini sangat prospektif untuk dikembangkan sebagai bahan obat antimalaria.

Permasalahannya, selama ini pemanfaatan kulit batang cempedak secara tradisional oleh masyarakat dalam mengobati penyakit malaria selama ini, tidak dapat menjamin kejegan khasiat, keamanan dan efektifitasnya. Sehingga sulit dipertanggung jawabkan secara medis. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemanfaatan tanaman ini sebagai produk fitofarmaka yang menggunakan pendekatan multikomponen, bukan strategi penemuan zat tunggal seperti pada obat modern. Dalam pengembangannya sebagai obat fitofarmaka, penting sekali dilakukan standarisasi terhadap bahan baku obat yang akan digunakan. Standarisasi suatu bahan baku obat adalah serangkaian prosedur dan cara pengukuran yang parameter hasilnya merupakan unsur-unsur yang terkait dengan konsep mutu kefarmasian, dalam artian memenuhi standar kimia dan biologis sekaligus jaminan stabilitas produk kefarmasian umumnya.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian untuk mendapatkan bahan obat fitofarmaka antimalaria dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* SPRENG) dalam bentuk ekstrak terstandar yang mempunyai kejegan kandungan kimianya. Sehingga dapat dijamin kejegan khasiat, keamanan dan efektifitasnya.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan penelitian, dimulai dari ekstraksi dan standarisasi ekstrak kulit batang cempedak. Standarisasi dimulai

dari pemeriksaan mikroskopis simplisia kulit batang cempedak yang akan digunakan, penetapan kadar senyawa marker serta profil kromatogram dengan KLT densitometri. Kemudian dilakukan pula pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* dan *in vitro* terhadap ekstrak terstandar, serta uji toksisitas dan keamanannya.

Pada tahun I telah dilakukan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Penyiapan dan pemeriksaan simplisia kulit batang cempedak secara mikroskopis. Telah diperoleh ciri mikroskopis dari simplisia kulit batang cempedak sebagai identitas dari tanaman cempedak (*A. champeden*).
2. Ekstraksi kulit batang cempedak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol. Fraksinasi ekstrak etanol dengan pelarut etil asetat dan n-butanol. Telah diperoleh ekstrak etanol (EEt), fraksi etil asetat (FEa) dan fraksi butanol (FB) yang pada identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid.
3. Uji antimalaria *in vitro* dan *in vivo* terhadap ekstrak, fraksi dan isolat yang diperoleh. Terhadap ekstrak etanol (EEt), fraksi etil asetat (FEa) dan fraksi butanol (FB) telah dilakukan uji antimalaria baik *in vivo* terhadap *Plasmodium berghei*, maupun *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum*. Dari hasil uji antimalaria *in vivo* diketahui bahwa ekstrak etanol mempunyai aktivitas yang lebih poten dibandingkan fraksi etil asetat maupun fraksi butanol. Oleh karena itu ekstrak etanol kulit batang cempedak ini dapat dinyatakan sebagai ekstrak aktif.
4. Terhadap ekstrak aktif ini kemudian dilakukan identifikasi dengan KLT-densitometri sebagai langkah awal untuk isolasi terhadap senyawa marker.

Dari hasil identifikasi ini diketahui adanya spot berwarna oranye intensif pada Rf 0,42, yang merupakan senyawa flavonoid dan dapat dijadikan sebagai marker dari ekstrak etanol kulit batang cempedak.

Selanjutnya terhadap ekstrak etanol dilakukan fraksinasi menggunakan metode KLT preparatif dengan fase gerak pelarut Metanol : Air (4/1 v/v) dan fase diam RP-18. Dari hasil fraksinasi ini diperoleh 6 fraksi utama (F1-F6). Hasil identifikasi dengan KLT menunjukkan bahwa spot oranye pada Rf 0,42 terdapat pada fraksi F3.

Pada uji aktifitas antimalaria *in vitro* terhadap ke 6 fraksi ini diketahui bahwa F3 merupakan fraksi aktif. Hasil identifikasi dengan KLT dan KLT-densitometri menggunakan pelarut Kloroform : Metanol (9,5/0,5 v/v) dan fase diam silika gel diketahui bahwa spot oranye pada Rf 0,13 merupakan senyawa flavonoid.

Berdasarkan hasil tersebut, maka pada tahun II penelitian dilanjutkan dengan melakukan tahapan isolasi senyawa marker dari fraksi aktif, standarisasi simplisia dan ekstrak etanol kulit batang cempedak, penetapan kadar marker dalam ekstrak etanol dan uji keamanan ekstrak meliputi uji toksisitas akut (nilai LD₅₀) dan toksisitas subakut (SGOT, SGPT dan gambaran hispatologi).

1.2 Rumusan masalah

1. Senyawa flavonoid apakah yang dapat dijadikan sebagai senyawa marker dari ekstrak kulit batang cempedak tersebut?
2. Bagaimana parameter standar dari ekstrak kulit batang cempedak?
3. Berapa nilai ED_{50} ekstrak kulit batang cempedak?
4. Bagaimana profil toksisitas akut (nilai LD_{50}) dan subakut dari ekstrak terstandar kulit batang cempedak?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Tanaman Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.)

2.1.1. Klasifikasi Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub Kelas	: Monochlamydeae
Bangsa	: Urticales
Suku	: Moraceae
Marga	: <i>Artocarpus</i>
Jenis	: <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. (Backer & Van Den Brink, 1965).
Sinonim	: <i>Artocarpus polyphema</i> Pers. (Heyne, 1987) <i>Artocarpus integer</i> (Thun) Merr.

2.1.2. Deskripsi Tanaman

A. champeden merupakan tumbuhan tropis dan tumbuh tersebar di Burma, Thailand, Malaysia, Sumatra, Borneo, Sulawesi, kepulauan Maluku dan Guinea Baru Bagian Barat. Tumbuh 500 m diatas permukaan laut, di tepian bukit yang lembab.

Habitat dari tanaman cempedak berupa pohon berumah satu, dengan tinggi 10-20 m, tumbuh liar atau ditanam di halaman rumah atau perkebunan, berbuah pada bulan Juli sampai September. Bentuk batangnya membulat dengan banyak getah. Kayunya yang berwarna kuning tua sampai coklat sangat keras, kuat dan dapat digunakan sebagai bahan bangunan

Helaian daun berbentuk eliptis 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 daun pendek dan menyempit, tepi rata, bagian atas daun mengkilat, berwarna hijau tua. Daun penumpu bulat telur memanjang.

Bunga berbentuk karangan, jantan atau betina. Sedangkan buahnya merupakan buah semu kerap kali tumbuh pada cabang, berbentuk silindris memanjang dengan bau menusuk, bertonjolan ringan, tonjolan piramidal, segi 4-7. Bijinya panjang (2-3 cm), diliputi oleh semacam lapisan daging biji berwarna kuning tua, lembut, tipis, mengandung banyak air dan terasa manis (Van Steenis, 1978; Heyne, 1987).

Menurut Van Steenis (1978) dan Backer (1965), tanaman *A. champeden* Spreng. di beberapa daerah, dikenal dengan berbagai nama antara lain : campedak, cempedak, nangka beurit (Sunda), cempedak (Papua), campedak, cepedak, cempedak, nangka cina (Jawa), nangka comedak, comedak, cempedak (Madura)



Gambar 2.1. Foto tanaman cempedak (*Artocarpus champeden*)

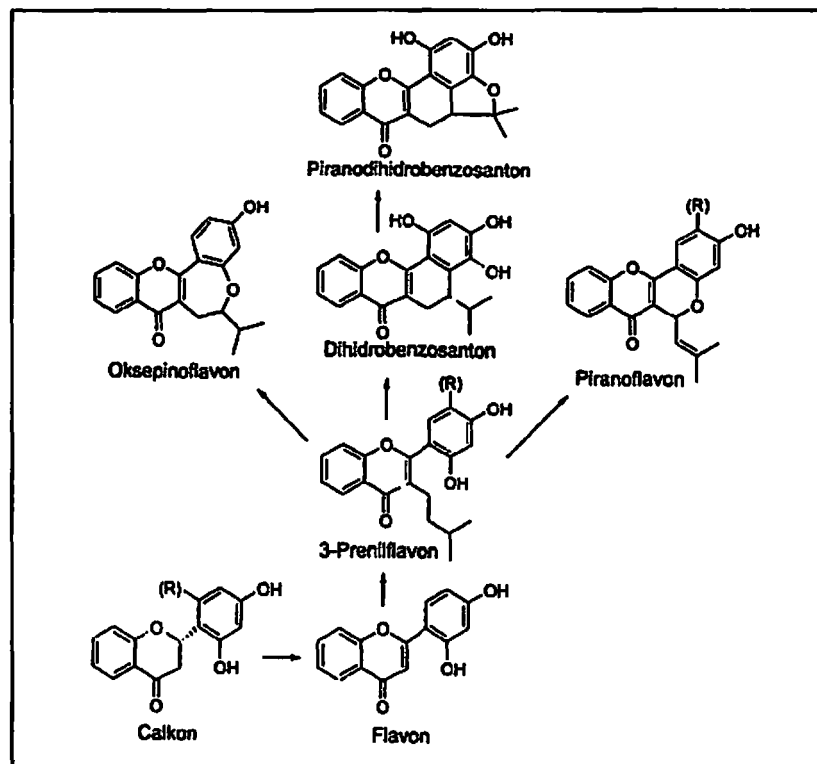
2.1.3. Kandungan Kimia

Artocarpus merupakan genus utama dari familia Moraceae (lebih kurang 60 spesies) yang menghasilkan beraneka ragam senyawa fenol terisoprenilasi (golongan senyawa flavonoid). Golongan senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol terbesar yang terdapat dalam tumbuhan dan telah diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis dan farmakologis.

Menurut Achmad (2004), tanaman cempedak (*A. champeden* Spreng.) mengandung beberapa jenis senyawa flavonoid yang dapat dikelompokkan menjadi tujuh macam (gambar 2.2) yaitu :

Flavanon	: Artokarpanon, Artoindonesianin E dan Heteroflavanon A
Flavon	: Norartocarpetin
3-prenilflavon	: Artokarpin, Kudraflavon C, Artoindonesianin Q, Artoindonesianin R, Artoindonesianin U dan Heterofilin
Oksepinoflavon	: Artoindonesianin B, Artonin A, Chaplashin
Piranoflavon	: Siklokomunol, Siklokomunin, Sikloartokarpin, Siklocampedol atau Artoindonesianin
Dihidrobensosanton	: Artoindonesianin T, Artoindonesianin S, Artoindonesianin V
Furanodihidrobensosanton	: Artoindonesianin A, Artoindonesianin M

Jenis-jenis senyawa ini adalah homogen dan mempunyai ciri khas dalam arti mengandung satu unit isoprenil yang terikat pada atom C₃ dan teroksigenasi pada posisi 2'4' atau posisi 2'4'5' pada cincin B dari kerangka flavon. Secara biogenesis, kerangka-kerangka karbon ini berasal dari 3-prenilflavon yang berturut-turut mengalami siklisasi yang melibatkan substituen isoprenil yang terikat pada C₃ dan cincin B. Struktur molekul yang demikian merupakan ciri khas senyawa-senyawa 3-prenilflavon dan merupakan indikator kemotaksonomi dari famili Moraceae (Achmad, 2004).



Gambar 2.2. Jenis-jenis flavonoid dari *A. champeden* Spreng. (Achmad, 2004)

2.1.4. Bioaktivitas *Artocarpus champeden* Spreng

Penelitian terhadap *A. champeden* Spreng. yang berkaitan dengan aktivitasnya pada parasit malaria telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Utomo (2003) meneliti aktivitas ekstrak metanol dan mendapatkan hasil bahwa ekstrak metanol mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei* secara *in vivo* pada mencit coba. Hidayati (2003) meneliti aktivitas fraksi kloroform secara *in vivo* dan hasilnya menunjukkan bahwa fraksi kloroform memiliki aktivitas antiplasmodial pada mencit yang diinfeksi *P. berghei*. Zaini (2005) melaporkan bahwa ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* ini juga menghambat pertumbuhan parasit *P. falciparum* pada kultur *in vitro* dengan $IC_{50} = 0,99 \mu\text{g/ml}$

dan *P. berghei in vivo* pada mencit dengan nilai $ED_{50} = 0,03$ mg/kg BB dengan route pemberian obat intraperitoneal.

Menurut Achmad (2004) flavonoid merupakan golongan senyawa utama yang terdapat dalam *A. champeden* Spreng. Senyawa flavonoid yang diisolasi dari tanaman ini mempunyai efek sitotoksik terhadap sel leukemia P 388 (Hakim, 2006). Senyawa artokarpin dan siklocampedol dari ekstrak kulit batang cempedak memberikan toksisitas yang tinggi terhadap *Artemia salina* pada uji *brain shrimp* sehingga diduga memiliki aktivitas antitumor (Hakim, 1998).

2.2. Senyawa Flavonoid dan Aktivitasnya Sebagai Antimalaria

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Struktur kimia senyawa flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, yaitu dua cincin benzen (C_6) yang terikat pada suatu rantai propan (C_3) sehingga membentuk susunan $C_6-C_3-C_6$. Istilah "flavonoid" yang diberikan untuk senyawa-senyawa fenol ini berasal dari kata *flavon*, yakni nama dari salah satu jenis flavonoid yang terbesar jumlahnya dan juga lazim ditemukan.

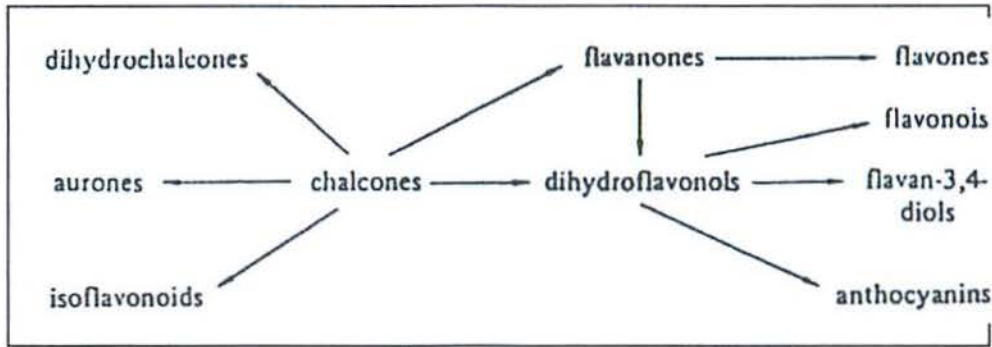
Terdapat beberapa jenis senyawa flavonoid, antara lain flavanon, flavonol, flavon, antosianidin, auron, khalkon dan sebagainya. Dari berbagai jenis flavonoid tersebut, senyawa flavon, flavonol dan antosianidin adalah jenis yang banyak ditemukan di alam sehingga seringkali dinyatakan sebagai flavonoid utama (mayor). Sedangkan senyawa khalkon, auron, flavanon,

dihidrokhalkon dan isoflavon disebut flavonoid minor karena penyebarannya terbatas (Harborne, 1987).

Salah satu jenis flavonoid yaitu khalkon, kemungkinan merupakan prekursor dari semua kelas flavonoid. Selanjutnya, sebagai akibat dari berbagai perubahan yang disebabkan oleh enzim selama proses biosintesis, ketiga atom karbon dari rantai propan dapat menghasilkan berbagai gugus fungsi seperti ikatan rangkap, gugus hidroksil, gugus karbonil dan sebagainya (Vickery, 1981).

Hal yang menarik dari penelitian terhadap khalkon, diketahui bahwa senyawa flavonoid minor ini mampu menghambat pertumbuhan parasit malaria dan menyebabkan akumulasi globin yang tidak terhidrolisis melalui mekanisme penghambatan enzim sistein protease parasit malaria *P. falciparum* (Biagini, 2003). *Licochalcone A*, yang diisolasi dari akar "Chinese licorice" diketahui dapat menghambat pertumbuhan parasit *P. falciparum* galur sensitif maupun resisten klorokuin (Chen, 1994).

Kutner (1987) melaporkan bahwa senyawa phlorizin, suatu glikosida bioflavonoid diketahui mempunyai efek antiplasmodial dengan mekanisme aksi menghambat sistem transport NPP, demikian juga dengan senyawa phloretin yang merupakan aglikon phlorizin. Kedua senyawa ini mempunyai efektifitas yang sama dalam menghambat transport sorbitol dari sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium*. Penelitian yang dilakukan Go (2004) menunjukkan bahwa senyawa-senyawa antiplasmodial jenis khalkon bekerja dengan menghambat hemolisis yang diinduksi oleh sorbitol pada eritrosit terinfeksi *P. falciparum*.



Gambar 2.3. Hubungan biogenetik senyawa-senyawa flavonoid (Vickery, 1981)

Beberapa penelitian mengenai senyawa khalkon, misalnya khalkon *phloridzin* telah ditemukan dapat berguna sebagai obat antimalaria. (Kutner, 1987). Senyawa *uvaretin* (*dibenzylated chalcones*) dan *diuvaretin* yang diisolasi dari *Uvaria* spp. (famili Annonaceae) mempunyai IC_{50} sebesar 3,49 dan 4,20 $\mu\text{g/ml}$ terhadap kultur *P. falciparum* secara *in vitro* (Philipson, 1991).

Sejauh ini telah diketahui hubungan senyawa flavonoid di dalam tanaman (terutama tanaman yang berasal dari keluarga Moraceae) dengan aktivitasnya sebagai antimalaria. Boonlaksiri (2000) melaporkan bahwa senyawa *stilbene* terpenilasi dari tanaman *A. integer* mempunyai aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap *P. falciparum* dengan nilai IC_{50} sebesar 1,7 $\mu\text{g/ml}$.

2.3. Penyakit malaria dan situasi global penyakit malaria

Malaria merupakan penyakit yang mempunyai tingkat prevalensi tinggi. Setiap tahunnya dapat menyebabkan kematian penduduk sekitar 1-2 juta orang dengan 300-500 juta orang yang terinfeksi. Penyakit ini lebih banyak terjadi pada negara miskin dan negara berkembang. Di Afrika prevalensi penyakit lebih

tinggi di bandingkan di negara lain. Di India diperkirakan 40% kasus malaria disebabkan karena *P. falciparum* (Ziegler, 2002; Saxena, 2003).

Malaria hampir ditemukan di semua negara tropis. Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa yang diperkirakan sekitar 150 spesies Plasmodium yang dapat ditransmisi melalui nyamuk sebagai vektor pada manusia, rodent, burung dan reptil. Lebih dari 90% kasus-kasus malaria ditemukan di sub Sahara Afrika yang menyebabkan lebih dari 2 juta orang meninggal tiap tahun dengan tingkat mortalitas yang tinggi pada anak-anak dan merupakan penyakit yang hiperendemik. Selain itu India dan Brasil juga merupakan daerah endemik malaria yang tinggi. Malaria juga endemik di Asia Tengah, Amerika tengah dan selatan (Kretzli, 2001; Banerjee, 2002; Burke, 2003).

Situasi malaria di Asia Tenggara (*South East Asia Region*) dilaporkan bahwa sejak tahun 2000, jumlah kasus bervariasi dan diperkirakan antara 2- 3 juta kasus setiap tahun. Kasus-kasus kematian karena malaria tiap tahun diketahui bahwa sekitar 70 % kasus dilaporkan dari India dan lebih dari 50 % pada kasus-kasus malaria di Myanmar (Bjorge, 2004).

Di Indonesia, penyakit malaria masih merupakan penyakit masyarakat terutama di daerah yang masih belum berkembang. Diperkirakan 60 % penduduk Indonesia tinggal di daerah endemis malaria yang tingkat edemisitasnya beragam. Menurut hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001, terdapat 70 juta penduduk tinggal di daerah endemik malaria dan 56,3 juta penduduk diantaranya tinggal di daerah endemik malaria sedang sampai tinggi dengan 15 juta kasus malaria klinis (DepKes, 2004).

Di Jawa-Bali, insiden malaria (*annual parasite incidence/API*) pada tahun 1997 adalah 12 per 100.000 penduduk dan kemudian meningkat tajam (tujuh kali) pada masa krisis ekonomi yaitu menjadi 81 per 100.000 penduduk pada tahun 2000. Di luar Jawa-Bali, insiden malaria klinis (*Annual Malaria Incidence/AMI*) jauh lebih tinggi dilaporkan dibandingkan Jawa-Bali yaitu 16 per 1000 penduduk pada tahun 1997 dan cenderung terus meningkat. Pada masa krisis ekonomi AMI meningkat hampir dua kali lipat yaitu menjadi 31 per 1000 penduduk dan meningkat lagi menjadi 46,5 per 1000 penduduk pada tahun 2003 (DepKes, 2004).

Hal ini karena, selain di luar Jawa - Bali merupakan daerah yang relatif belum berkembang, penggunaan obat yang tidak tepat karena keterbatasan kemampuan pemeriksaan hapusan darah malaria mengakibatkan berkembangnya parasit resisten terhadap obat standar yang dipakai dan kemungkinan terjadinya KLB. Selama tahun 2003, telah terjadi KLB di beberapa daerah dan dilaporkan 205 dari 3.069 penderita malaria meninggal dengan angka kematian 6,7 % (Sub Direktorat Malaria, 2004).

Kasus-kasus malaria menyebabkan beban penyakit juga sangat tinggi. Malaria dapat mengakibatkan anemia, aborsi, kematian janin, prematuritas, berat badan lahir rendah dan kerugian ekonomi (*economic loss*) yang cukup tinggi di daerah endemis. Oleh sebab itu kasus-kasus malaria harus segera ditangani dengan cepat dan diberi pengobatan yang tepat untuk menurunkan angka kesakitan, mencegah menjadi berat dan komplikasi, mencegah penularan serta meminimalkan dampak terhadap penyakit bagi kesehatan masyarakat (Tjitra, 2004).

2.4. Parasit Resistensi Obat Malaria

2.4.1 Obat antimalaria

Obat antimalaria yang tersedia di dunia umumnya dapat dikelompokkan sebagai berikut : (1) obat malaria kelompok kuinolin yaitu : klorokuin, kina, primakuin, amodiakuin, meflokuin dan halofantrin. (2) Obat malaria kelompok anti-folat yaitu : sulfadoksin, pirimetamin, proguanil, klorproguanil dan dapson. (3) Kelompok obat antimalaria baru yaitu : artemisinin, lumefrantrin, atovakuon, tafenukuin, pironaridin, piperaquin, artemison, WR99210 dan antibiotik (WHO, 2001 *dalam* Tjitra, 2003).

Mekanisme kerja klorokuin umumnya menaikkan pH vakuola makanan parasit sehingga pH vakuola makanan menjadi basa. Dalam pH tersebut klorokuin menghambat pembentukan hemozoin dari heme bebas yang diproduksi parasit dengan mencerna hemoglobin host. Heme bebas yang terakumulasi di dalam vakuola makanan menyebabkan lisis membran dan menghambat berbagai proses metabolisme parasit sehingga menyebabkan kematian parasit (Wiser, 2001; Wiser, 2004).

Klorokuin dan obat antimalaria kelompok kuinolin lainnya telah digunakan untuk kemoterapi lebih dari 40 tahun yang lalu. Keberhasilannya didasarkan pada toksisitasnya yang terbatas, kemudahan penggunaan dan keefektifan biaya. Namun kasus-kasus resistensi parasit akhir-akhir ini menyebabkan kurang mempannya penggunaan kelompok kuinolin dalam kemoterapi malaria (Biagini, 2003).

Begitu juga penggunaan artemisinin yang digunakan untuk terapi multidrug resisten *P. falciparum* terbatas karena daya larutnya yang rendah

dalam air maupun minyak, sehingga dibuat senyawa-senyawa derivatnya secara semi sintesis yang tetap membutuhkan artemisinin sebagai bahan dasar . Analog-analog peroxide sintesis juga telah dibuat seperti 1,2,4-trioxane, fenozan BO-7, dispiro tetraoxane dan arteflene (Biagini, 2003; Olliaro, 2004).

2.4.2 Kasus Resistensi obat antimalaria

Perkembangan problem malaria secara global menjadi semakin besar disebabkan karena resistensi parasit sehingga mengurangi aktivitas dan kemampuan obat-obat antimalaria (*limited armamentarium of antimalaria drugs*) (Biagini, 2003).

Parasit telah mengembangkan banyak cara untuk mengatasi toksisitas obat yaitu dengan mutasi pada gen target, berkurangnya akumulasi obat dan inaktivasi obat. Rendahnya akumulasi obat misalnya, menyebabkan lebih sedikit obat yang mencapai target.

Perkembangan resistensi pada obat-obat malaria lapis pertama (*front-line antimalaria compound*) yang digunakan dalam pencegahan dan pengobatan malaria di dasawarsa terakhir ini merupakan problem utama dalam penanggulangan malaria. *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin telah ditemukan di seluruh bagian negara tropis di dunia, yaitu Afrika Timur, Pasifik Barat, Asia Barat, Asia Tenggara dan sekitarnya, termasuk Bangladesh, Butan, India, Myanmar dan Thailand (WHO, 2003; Krettli , 2001).

Di lima dekade terakhir ini resistensi obat terhadap *P. falciparum* menjadi suatu issue yang sangat penting. WHO, (1973) dalam Noedl (2003) mendefinisikan resistensi obat (*drug resistance*) sebagai kemampuan dari suatu

strain parasit untuk survive dan tetap mengalami multiplikasi meskipun diberikan obat dan mengabsorpsi dalam dosis yang lebih besar dari dosis yang biasanya diberikan tanpa adanya toleransi dari parasit.

Di Indonesia sendiri, *P. falciparum* resisten klorokuin telah ditemukan di 12 propinsi pada 14 kabupaten yaitu Propinsi Nangrauh Aceh Darusalam, Lampung, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, Kalimantan Barat, Nusa Tenggara Timur, Papua, Maluku, Maluku Utara dan DKI Jakarta. *P. falciparum* yang resistens klorokuin pertama kali ditemukan pada tahun 1974 di Kalimantan Timur dan terus meluas ke beberapa wilayah. Hal ini karena mobilitas penduduk antar wilayah yang semakin meningkat sehingga malaria tidak dapat segera diberantas di suatu wilayah. Faktor lain yang juga berpengaruh yaitu tidak dipatuhinya minum obat sesuai aturan. Resistensi parasit terhadap obat-obat antimalaria ini menyebabkan kesulitan dalam program kontrol malaria di Indonesia (DepKes, 2004). Penelitian awal menunjukkan bahwa resistensi terjadi melalui beberapa mekanisme yang berbeda, termasuk adanya perubahan pada transport obat atau target enzim yang mengakibatkan penurunan afinitas ikatan obat dengan inhibitor. Sejak dipelajarinya parasitologi molekuler pada tahun 1980, telah diperoleh kemajuan untuk memahami mekanisme resistensi dari obat antimalaria yang paling banyak digunakan yaitu kuinolon analog dan antifolat. Target obat tersebut, tidak mempan lagi untuk membunuh parasit malaria dan cenderung menimbulkan resistensi parasit.

Resistensi parasit terhadap klorokuin pertama kali dilaporkan di Dakar tahun 1988. Resistensi parasit terhadap klorokuin misalnya, diketahui

disebabkan oleh adanya mutasi pada gen *pfmdr1* yang mengkode P glycoprotein homolog (Pgh1). Diduga terjadi juga mutasi pada gen-gen yang tidak teridentifikasi yang melengkapi terjadinya resistensi ini (Rosenthal, 2001; Daily, 2003; Burke, 2003). Resistensi Fansidar (kelompok antifolat) dihubungkan dengan mutasi-mutasi pada enzim yang ditargetkan oleh sulfadoxin dan pyrimetamin. Sedangkan resistensi klorokuin dihubungkan dengan mutasi pada suatu transporter yang ditemukan dalam vakuola makanan parasit (*chloroquin resistance transporter*=CRT), transporter lain dalam vakuola makanan yaitu *multi-drug resistance gene 1* (MDR 1), *pfcr1* gen dan mekanisme lain yang belum jelas (Wiser, 2003; Daily, 2003).

2.5. Studi pendahuluan yang telah dilakukan

Rangkaian penelitian untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari *Artocarpus champeden* telah kami lakukan :

1. Penelitian yang dilakukan oleh Utomo, dkk (2003) menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*) mempunyai aktivitas antimalaria *in vivo* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan nilai $IC_{50} = 6,95$ mg/kg BB mencit
2. Hidayati, dkk (2003) menunjukkan bahwa fraksi kloroform dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*) mempunyai aktivitas antimalaria *in vivo* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan $IC_{50} = 2$ mg/kg BB mencit

3. Zaini, dkk (2005), melaporkan bahwa beberapa isolat yang berhasil diperoleh dari tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria yang bervariasi.
4. Zaini, dkk (2006), melaporkan bahwa senyawa flavonoid terpenilasi dari *A. champeden* SPRENG. yaitu sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R dan morachalkon A memiliki aktivitas antimalaria yang poten melalui hambatan degradasi haemoglobin dan detoksifikasi heme.
5. Widyawaruyanti, dkk (2007), melaporkan bahwa telah diperoleh sembilan senyawa flavon terpenilasi dari tanaman ini. Diketahui bahwa ke sembilan senyawa ini mempunyai aktivitas antimalaria, dan heteroflavanon C merupakan senyawa yang paling poten dari ke sembilan senyawa ini
6. Widyawaruyanti, dkk (2008), melaporkan bahwa ekstrak etanol 80% kulit batang cempedak mempunyai aktivitas hambatan baik terhadap parasit *P. berghei in vivo* dan *P. falciparum in vitro* lebih poten dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi butanol.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Penelitian Tahun I

1. Mendapatkan simplisia kulit batang cempedak yang terstandar melalui pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis menurut MMI (Materia Medika Indonesia).
2. Menetapkan ekstrak kulit batang cempedak yang mempunyai aktivitas antimalaria.
3. Menentukan profil kromatogram dan spectrum densitometri ekstrak aktif dan senyawa marker dari ekstrak aktif kulit batang cempedak.

3.1.2 Tujuan Penelitian Tahun II

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa marker dari ekstrak etanol aktif antimalaria kulit batang cempedak
2. Melakukan penelitian metode standarisasi optimal (penetapan kadar senyawa marker, *fingerprint* kromatogram instrumental) untuk diaplikasikan pada bahan baku dan produk ekstrak
3. Menentukan dosis efektif dari ekstrak terstandar kulit batang cempedak sebagai antimalaria
4. Menguji toksisitas dan keamanan ekstrak terstandar kulit batang cempedak

3.2 Manfaat Penelitian

Diharapkan hasil akhir dari rangkaian penelitian ini adalah :

1. Memberikan landasan ilmiah tentang aktivitas antimalaria dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) dan juga akan didapat bahan baku fitofarmaka obat antimalaria dari ekstrak kulit batang *Artocarpus champeden* terstandar yang terbukti berkhasiat, efektif dan aman.
2. Diperoleh senyawa marker dari ekstrak aktif kulit batang cempedak dengan hasil identifikasinya secara kromatografi dan spektroskopi.
3. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan potensi obat tradisional dan sumber daya alam Indonesia berdasarkan teknologi kefarmasian, yang selama ini masih bersifat empiris.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

4.1.1. Bahan Tanaman

Kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*) yang diperoleh dari Bogor, Jawa Barat, pada bulan Juni 2008 dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, (LIPI-Bogor) Bogor, Jawa Barat.

4.1.2. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan untuk penentuan aktivitas antimalaria *in vivo* dan uji toksisitas adalah mencit jantan dewasa (2-3 bulan dengan berat 22 - 25 gram), galur *BALB/C* yang diperoleh dari kandang hewan percobaan, Pusvetma - Wonocolo, Surabaya.

Hewan coba yang digunakan untuk uji teratogenik adalah mencit betina umur 2-3 bulan dengan berat badan 20 – 30 gram yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

4.1.3. Suspensi Parasit

Plasmodium berghei strain ANKA dan *Plasmodium falciparum* strain 3D7 yang diperoleh dari Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta



4.1.4. Bahan Kimia

Bahan untuk isolasi, identifikasi dan standarisasi:

Metanol p.a, metanol teknis, etanol teknis, kloroform p.a, n-heksana p.a, etil aasetat p.a, asetonitril p.a, aquadest, butanol teknis, Silika Gel-60 (mesh 60 - 230 ASTM), lempeng alumunium KLT Silica Gel-60 F 254 *normal phase* dan *reverse phase* (0.25, dan 0.5 mm), ODS Cosmosil 140 C18 Prep Nacalai Tesque. Inc. Kyoto Japan, asam sulfat 10%.

Bahan untuk penentuan aktivitas antimalaria *in vivo*:

Giemsa, DMSO, metanol, aquadest, suspensi CMC-Na 0,5%, Oleum Immersi.

Bahan untuk penentuan aktivitas antimalaria *in vitro*:

Media RPMI 1640 (Gibco), sel darah merah (RBC), serum manusia, Giemsa, HEPES, hypoxanthin, gentamycin, dapar phosphate, natrium bikarbonat.

Bahan untuk penentuan toksisitas dan keamanan:

Formalin 10%, hematoxylin eosin, xylol, paraffin cair, dan kanada balsam.

4.2. Alat-alat Penelitian

Alat untuk isolasi, identifikasi dan standarisasi:

Alat-alat gelas, kolom kromatografi, maserator, vacuum evaporator, pipet Pasteur, KCKT Agilent 1100, kolom Microsorb RP-18, Camag TLC Scanner 3, filter membran 0,2 μm , Spektrofotometer uv vis Lambda EZ-21 Perkin Elmer.

Alat untuk penentuan aktivitas antimalaria *in vivo*:

Alat-alat gelas, mortir dan stamper, kaca objek, pinset, gunting, spuit 3 cc.

Alat untuk penentuan aktivitas antimalaria *in vitro*:

Pipet pasteur, tabung kultur, botol kultur, tabung kultur mikro (*microweell plate*), autoklaf, inkubator, *laminar air flow*, filter membran 0,2 μm

Alat untuk penentuan toksisitas dan keamanan:

Alat-alat bedah (gunting, pisau, pinset), alat-alat gelas, kaca objek

4.3. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Hewan Coba Universitas Airlangga, Surabaya.

4.4. Cara Kerja**4.4.1. Ekstraksi kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*)**

Sebanyak 1 kg serbuk kulit batang cempedak dimaserasi dengan pelarut etanol 80% sebanyak 5 L di dalam labu rotavapor selama 2 jam pada suhu 60°C. Kemudian disaring dan ekstrak dipisahkan. Residu dikeringkan dan dimaserasi kembali dengan 5 L etanol 80% selama 2 jam. Proses ini dilakukan sebanyak 3 kali. Ekstrak dikumpulkan, diendapkan selama 1 malam, disaring dan diuapkan dengan vakum ratovapor sehingga diperoleh ekstrak etanol (EEt) pekat, sebanyak 20% dari total volume ekstrak.

Terhadap ekstrak etanol pekat kemudian dilakukan partisi cair-cair pada corong pisah menggunakan pelarut etil asetat (2 : 1). Dilakukan pengocokan secara kostan dan perlahan selama 5 menit, kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas yang merupakan fase etil asetat ditampung dalam labu bersih. Lapisan bawah kemudian ditambah lagi pelarut etil asetat (2 : 1), dikocok dan fase etil asetat dipisahkan. Prosedur ini dilakukan beberapa kali

sampai lapisan etil asetat tidak berwarna. Fase etil asetat kemudian dikumpulkan, lalu ditambahkan natrium sulfat eksikatus, didiamkan semalam dan dipisahkan. Selanjutnya fase etil asetat dipekatkan dalam rotavapor sehingga diperoleh fraksi etil asetat (FEa)

Lapisan bawah kemudian ditambahkan pelarut n-butanol jenuh air (1:2). Dilakukan pengocokan secara konstan dan perlahan selama 5 menit, kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas yang merupakan fase butanol ditampung dalam labu bersih. Prosedur ini dilakukan beberapa kali. Fase butanol kemudian dikumpulkan, dipekatkan dalam rotavapor hingga diperoleh fraksi butanol pekat (FB).

4.4.2 Isolasi Senyawa Marker

1. Fraksinasi Ekstrak Etanol dengan Kromatografi kolom

Terhadap 11 g ekstrak etanol dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam ODS Cosmosil 140 C18 Prep dan fase gerak berturut-turut metanol:air (4:1 v/v), metanol, metanol:asetonitril (1:1 v/v), dan asetonitril.

2. Subfraksinasi Fraksi hasil pemisahan ekstrak etanol

Terhadap fraksi yang mengandung spot orange intensif (identifikasi secara KLT dengan fase diam silika gel, fase gerak kloroform:metanol 10%, atau fase diam RP-18, fase gerak metanol:air (4:1 v/v) dan penampak noda H₂SO₄ 10%) dilakukan pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan fase diam silika gel, fase gerak kloroform:metanol 10%.

3. Pemurnian subfraksi hasil pemisahan fraksi

Terhadap subfraksi yang berupa spot orange intensif dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam ODS Cosmosil 140 C18 Prep dan fase gerak metanol:air (7:3 v/v).

4.4.3 Penetapan Parameter Standar Nonspesifik Simplisia Cempedak

1. Penetapan kadar abu

Terhadap simplisia cempedak dilakukan penetapan kadar abu dengan cara sebagai berikut: krus silikat/platina dipijar dan ditara hingga bobot konstan. Simplisia sebanyak 2-3 gram dimasukkan ke dalam krus dan diratakan kemudian ditimbang. Krus yang berisi simplisia dipijarkan lagi dan didinginkan. Setelah dingin, krus ditimbang lagi. Langkah ini dilakukan hingga bobot konstan. Jika arang tidak hilang, maka ditambahkan air panas kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu, sisa dan kertas saring di pijar dengan krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus kemudian dipijar.

2. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan simplisia dilakukan dengan cara sebagai berikut: botol timbang dangkal bertutup pada suhu 105° C dipanaskan selama 30 menit dan ditara hingga bobot konstan. Ditimbang simplisia sebanyak 1-2 gram dan diratakan diatas botol timbang dengan ketebalan 5-10 mm. Botol timbang yang berisi simplisia dimasukkan ke dalam ruang pengeringan dengan dibuka tutupnya, suhu pengeringan 105° C dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu didinginkan dalam eksikator dalam kondisi botol timbang tertutup kemudian ditimbang hingga didapatkan bobot konstan.

4.4.4 Penetapan Parameter Standar Nonspesifik Ekstrak Etanol Cempedak

1. Penetapan kadar abu

Terhadap ekstrak cempedak dilakukan penetapan kadar abu dengan cara sebagai berikut: krus silikat/platina dipijar dan ditara hingga bobot konstan. Ekstrak sebanyak 2-3 gram dimasukkan ke dalam krus dan diratakan kemudian ditimbang. Krus yang berisi ekstrak dipijarkan lagi dan didinginkan. Setelah dingin, krus ditimbang lagi. Langkah ini dilakukan hingga bobot konstan. Jika arang tidak hilang, maka ditambahkan air panas kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu, sisa dan kertas saring di pijar dengan krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus kemudian dipijar.

2. Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam

Penetapan kadar abu yang tidak larut asam dilakukan dengan cara sebagai berikut: abu yang telah didapatkan dalam penetapan kadar abu, ditambahkan 25 ml asam klorida encer P dan dididihkan selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dikumpulkan dan disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas kemudian dipijarkan.

3. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara: disiapkan sejumlah toluen P yang dikocok dengan sedikit air dan dibiarkan memisah kemudian lapisan air dibuang. Sebelumnya alat dibersihkan dengan asam pencuci dengan dibilas air dan dikeringkan. Ditimbang sejumlah ekstrak yang kira – kira mengandung 2-4 ml air pada sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu dan dimasukkan ke dalam labu, ditambahkan pasir kering untuk menghindari gejolak mendadak, ditambahkan toluen sebanyak 200 ml, toluen

dituang ke dalam labu penerima melewati pipa pendingin. dipanaskan selama \pm 15 menit sampai mulai mendidih. Kecepatan penetesannya diatur \pm 2 tetes perdetik hingga sebagian air tersuling kemudian kecepatan penetesannya dinaikkan hingga 4 tetes per detik. Kemudian semua air tersuling disetek, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen menggunakan sikat tabung yang disambungkan dengan kawat tembaga yang dibasahi dengan toluen. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit kemudian dimatikan dan didinginkan. Tetesan air dibersihkan dengan toluen menggunakan sikat tabung yang disambungkan dengan kawat tembaga yang dibasahi dengan toluen. Toluena dibiarkan memisah sempurna kemudian dihitung persen kadar air.

4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan ekstrak dilakukan dengan cara sebagai berikut: botol timbang dangkal bertutup pada suhu 105° C dipanaskan selama 30 menit dan ditara hingga bobot konstan. Ditimbang ekstrak sebanyak 1-2 gram dan diratakan diatas botol timbang dengan ketebalan 5-10 mm. Botol timbang yang berisi ekstrak dimasukkan ke dalam ruang pengeringan dengan dibuka tutupnya, suhu pengeringan 105° C dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu didinginkan dalam eksikator dalam kondisi botol timbang tertutup kemudian ditimbang hingga didapatkan bobot konstan. Jika ekstrak sulit kering dan mencair pada pemanasan, maka dicampurkan silika yang telah dikeringkan dan disimpan dalam eksikator sampai suhu kamar sebanyak 1 gram, silika tersebut dicampur secara rata dengan ekstrak saat panas kemudian dikeringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap.

5. Penetapan Kadar Cemar Logam Berat

Penetapan cemaran logam berat bertujuan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Cd, Pb dll) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan. Penetapan cemaran logam berat dalam ekstrak dilakukan dengan metode sebagai berikut: masukkan sejumlah ekstrak (tidak lebih dari 2 g) ke dalam krus silika dan 4 ml larutan magnesium sulfat P 25% dalam asam sulfat 2N. Aduk dengan batang pengaduk kaca kecil dan panaskan hati-hati. Jika campuran berbentuk cairan, uapkan perlahan-lahan pada suhu tidak lebih dari 800°C, dan lanjutkan pemanasan hingga sisa berwarna putih atau keabu-abuan. Biarkan dingin, basahkan sisa dengan 0,2 ml asam sulfat 2N uapkan, pijarkan kembali dan biarkan dingin. Lama pemijaran tidak boleh lebih dari 2 jam. Larutkan sisa dalam 5 ml asam klorida 2N tambahkan lagi 5 ml asam klorida 2N. Tambahkan 0,1 ml fenolftalein LP dan amonium hidroksida 13N tetes demi tetes sehingga berwarna merah muda. Dinginkan tambahkan asam asetat glasial P hingga larutan tidak berwarna, dan tambahkan lagi 0,5 ml. Saring jika perlu dan encerkan larutan dengan air hingga 20 ml. Ke dalam 12 ml larutan di atas, tambahkan 2 ml dapar asetat pH 3,5 campur, tambahkan 1-2 ml sebaiknya dengan lempeng pemanas dengan suhu tidak lebih dari 120°C sampai mulai pengarangan (jika diperlukan penambahan asam sulfat P untuk membasahi spesimen secara sempurna, tambahkan hati-hati melalui kondensor, tetapi jumlahnya tidak boleh lebih dari 10 ml). Setelah zat uji terurai oleh asam, tambahkan hati-hati melalui pendingin, tetes demi tetes hidrogen peroksida P, biarkan reaksi reda dan panaskan lagi diantara penetes (tambahkan beberapa

tetes pertama dengan sangat hati-hati dengan pencampuran yang cukup, untuk mencegah reaksi yang cepat; hentikan pemanasan jika terjadi buih berlebihan). Jika reaksi telah reda, panaskan hati-hati, goyang labu sesekali untuk mencegah zat melekat pada dinding dasar labu yang kontak dengan pemanas. Pertahankan kondisi oksidasi selama digesti dengan penambahan sedikit hidrogen peroksida apabila campuran menjadi coklat atau hitam. Lanjutkan digesti sampai zat organik terurai, dan kemudian refluks campuran selama 1 jam. Hentikan sirkulasi air pendingin, dan panaskan hingga terjadi asap putih belerang trioksida berlebih dan larutan menjadi tidak berwarna atau sedikit kekuningan. Dinginkan dan tambahkan 10 ml air hati-hati melalui kondensor, sambil menggoyangkan labu. Panaskan kembali hingga terjadi uap putih. Dinginkan, tambahkan 15 ml air hati-hati. Lepaskan pendingin, bilas dinding labu sebelah dalam dengan beberapa ml air hingga diperoleh volume 35 ml. Tambahkan 1 ml larutan kalium permanganat, didihkan selama beberapa detik dan dinginkan.

4.4.5 Penetapan standar ekstrak etanol cempedak terhadap parameter kadar marker

1. Validasi Metode dengan KCKT

a. Pembuatan Larutan Standar

Dibuat larutan baku induk marker dengan cara menimbang senyawa marker 0,7 mg kemudian dilarutkan dalam metanol sampai volume 1,0 ml (700 ppm). 70 μ l larutan ditambah metanol sampai volume 490 μ l (100 ppm). Kemudian dibuat larutan baku kerja dengan kadar 20 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm.

- a. Larutan baku kerja 20 ppm
Diambil 20 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- b. Larutan baku kerja 30 ppm
Diambil 30 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- c. Larutan baku kerja 35 ppm
Diambil 35 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- d. Larutan baku kerja 40 ppm
Diambil 40 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- e. Larutan baku kerja 45 ppm
Diambil 45 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- f. Larutan baku kerja 50 ppm
Diambil 50 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- g. Larutan baku kerja 60 ppm
Diambil 60 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l
- h. Larutan baku kerja 70 ppm
Diambil 70 μ l larutan baku induk 100 ppm ditambah metanol sampai volume 100 μ l

b. Penentuan Selektivitas Eluen

10 mg ekstrak etanol kulit batang cempedak dilarutkan dengan metanol sampai volume 1 ml. 50 μ l diinjeksikan dalam KCKT Agilent 1100, suhu kolom 30°C, *stop time* 20 menit, dengan fase gerak sebagai berikut:

- Metanol : air = 80 : 20
- Metanol : air = 75 : 25
- Metanol : air = 70 : 30
- Metanol : air = 65 : 35
- Metanol : air = 60 : 40
- Metanol : air = 55 : 45

Pengamatan dilakukan pada 254, 365 dan 385 nm. Kemudian dilihat harga resolusi dan selektivitas. Pemisahan dianggap baik bila harga resolusi $> 1,5$, selektivitas > 1 , *plate number* > 2000 , dan lebar puncak 0,5-1,5.

c. Linieritas

Linieritas ditentukan dengan menginjeksikan masing-masing 50 μ l (kapasitas KCKT = 20 μ l) larutan standar 20 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm pada KCKT Agilent 1100. Kemudian dievaluasi dengan eluen terpilih pada 385 nm. Hitung regresi linier antara kadar dan luas area.

d. Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dengan sebanyak 7 ppm, 5,2 ppm, 3,5 ppm, 2,8 ppm, 1,4 ppm, 0,7 ppm, dan 0,5 ppm. Luas area yang diperoleh digunakan untuk menentukan LOD dan LOQ.

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times \text{SD}}{\text{slope}}$$

slope

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{slope}}$$

slope

e. Akurasi

1. Ditimbang ekstrak etanol sebanyak 10,0 mg dan marker (80-120% diatas kadar dalam sampel). Replikasi 6 kali.
2. Ditimbang ekstrak etanol sebanyak 10,0 mg kemudian ditambahkan metanol sampai volume 1 ml. Replikasi 6 kali.
3. Masing-masing diinjeksikan ke dalam KCKT Agilent 1100 sebanyak 50 μl bersama larutan standar 20 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm yang masing-masing diinjeksikan ke dalam KCKT sebanyak 50 μl , menggunakan fase gerak terpilih dan diukur areanya pada panjang gelombang terpilih (385 nm). Dari kadar yang didapat akan digunakan untuk menghitung % rekovery.

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Ct}}{\text{Cp} + \text{Cst}} \times 100\%$$

dimana Ct = kadar marker yang diperoleh (poin 3)

Cp = kadar marker dalam sampel (poin 2)

Cst = kadar standar marker yang ditambahkan (poin 1)

f. Presisi

Ditimbang ekstrak kering sebanyak 10 mg, ditambah metanol sampai volume 1 ml. Kemudian diinjeksikan ke dalam KCKT Agilent 1100 sebanyak 50 μl bersama larutan standar 20 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm yang masing-masing diinjeksikan ke dalam KCKT

sebanyak 50 μ l, menggunakan fase gerak terpilih dan diukur areanya pada panjang gelombang terpilih. Kadar marker yang didapat digunakan untuk menghitung standar deviasi dan koefisien variasi.

2. Penetapan kadar marker dalam Ekstrak Etanol kulit batang cempedak

Ditimbang ekstrak kering sebanyak 10 mg, ditambah metanol sampai volume 1 ml kemudian digetarkan dengan penggetar ultrasonik selama 5 menit. Replikasi minimal 3 kali. Kemudian diinjeksikan ke dalam KCKT Agilent 1100 sebanyak 50 μ l bersama larutan standar 20 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm yang masing-masing diinjeksikan kedalam KCKT sebanyak 50 μ l, menggunakan fase gerak terpilih dan diukur areanya pada panjang gelombang terpilih. Hasilnya merupakan % berat dan diukur pula koefisien variasinya.

3. Penetapan profil kromatogram KCKT ekstrak etanol *A. champeden*

Ditimbang ekstrak kering sebanyak 10 mg, ditambah metanol sampai volume 1 ml kemudian digetarkan dengan penggetar ultrasonik selama 5 menit. 50 μ l larutan sampel diinjeksikan pada KCKT Agilent 1100, kolom Microsorb RP-18, suhu kolom 30°C, dengan fase gerak metanol-air (55:45 v/v), pada panjang gelombang 385 nm.

4.4.6 Penentuan Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Kulit Batang Cempedak secara *in vivo* pada mencit

1. Penginfeksian Mencit Donor

Penginfeksian *P. berghei* dilakukan dengan cara menginjeksikan darah yang terinfeksi *P. berghei* pada tubuh mencit. Bahan yang digunakan untuk menginfeksi mencit donor adalah simpanan beku eritrosit yang terinfeksi *P. berghei*. Pada mulanya, simpanan beku tersebut dinaikkan suhunya dengan cara dihangatkan dengan telapak tangan sambil diputar-putar agar sesuai dengan suhu tubuh mencit. Setelah itu, simpanan tersebut diinjeksikan ke dalam tubuh mencit secara intraperitoneal (disuntikkan pada rongga perutnya) sebanyak 200 μ L. Pertumbuhan parasit diamati setiap hari dengan cara mengambil satu tetes darah dari ekor dan dibuat hapusan darah tipis dengan pewarna giemsa. Apabila parasitemia mencapai 20%, dilakukan pembedahan mencit untuk mengambil darah yang mengandung *P. berghei* secara intrakardial (dari jantung) untuk diinfeksi ke mencit uji.

2. Penyiapan Mencit Uji

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok ekstrak etanol cempedak dengan dosis 1 mg/kg BB; 10 mg/kg BB; dan 100 mg/kg BB.

Setiap mencit uji diinfeksi dengan *P. berghei* secara intraperitoneal. Kemudian dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan parasit setiap hari. Bila pada pengamatan ditemukan adanya parasit malaria yang tumbuh (1-2 hari setelah penginfeksian), maka uji aktivitas antimalaria segera dilakukan.

3. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol cempedak dengan dosis 1 mg/kg BB; 10 mg/kg BB; dan 100 mg/kg BB. Dengan asumsi bahwa berat badan standar mencit adalah 25 gram dan volume tiap pemberian adalah 250 μ L, maka perhitungan dosis didasarkan atas berat badan tersebut. Bila mencit yang diuji memiliki berat badan yang lebih atau kurang dari berat standar maka dilakukan konversi sesuai dengan ekivalennya.

Cara pembuatan larutan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Larutan uji 100 mg/kg BB dibuat dengan cara menimbang zat uji sejumlah 100 mg dan disuspensikan dengan larutan CMC Na 0,5% sampai volume 10 mL.
2. Larutan uji 10 mg/kg BB dibuat dengan cara mengambil 1 mL (1) dan disuspensikan dengan larutan CMC Na 0,5% sampai volume 10 mL.
3. Larutan uji 1 mg/kg BB dibuat dengan cara mengambil 1 mL (2) dan disuspensikan dengan larutan CMC Na 0,5% sampai volume 10 mL.

4. Pengujian Aktivitas Antimalaria secara *in vivo*

Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor mencit untuk dihitung tingkat parasitemianya. Pengujian aktivitas anti malaria dimulai ketika hapusan darah yang diambil dari seluruh mencit yang digunakan dalam penelitian mengandung parasit malaria. Pemberian larutan uji ekstrak etanol cempedak secara peroral dilakukan pada hari ke-0 sampai hari ke-3. Parasitemia diamati setiap hari mulai hari ke-0

sampai hari ke-6 untuk mengamati perkembangan aksi obat, sedangkan ED₅₀ dihitung dari data pada hari ke-4.

5. Pengamatan Pertumbuhan Parasit

a. Pembuatan Hapusan Darah

Pengamatan pertumbuhan parasit dilakukan dengan membuat hapusan darah tipis, diwarnai dengan giemsa 10% dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Hapusan darah dibuat dengan cara meneteskan ± 1 tetes darah dari ekor mencit terinfeksi *P. berghei*. Pembuatan hapusan darah dilakukan setiap hari. Pada pengamatan ini, parasit malaria tampak memiliki inti yang berwarna merah dan plasma yang berwarna biru, sedangkan sel darah berwarna merah muda.

b. Penghitungan Parasitemia

Perhitungan parasitemia dilakukan dengan cara membandingkan jumlah eritrosit yang terinfeksi *P. berghei* dengan eritrosit yang tidak terinfeksi. Perhitungan ini dilakukan pada tiap 5000 eritrosit.

c. Pengumpulan Data

Persen Pertumbuhan

Persen pertumbuhan parasit ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

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

Persen Penghambatan

Persen penghambatan parasit menggunakan data parasitemia dari hari ke-0 sampai hari ke-4. Persen penghambatan ini ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ penghambatan} = 100\% - (X_e/X_k) \times 100\%$$

X_e = % pertumbuhan rata-rata parasit pada tiap kelompok uji

X_k = % pertumbuhan rata-rata parasit pada kontrol negatif

d. Analisis Data

Variabel penelitian yaitu :

- a. Variabel bebas yaitu : konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak
- b. Variabel tergantung yaitu : persentase parasitemia

Hambatan pertumbuhan 50% (ED_{50}) ditentukan menggunakan analisa Probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (*probability unit*) persen penghambatan dengan logaritma dosis menggunakan persamaan garis regresi linier. ED_{50} adalah dosis uji dimana persen penghambatan terhadap pertumbuhan parasit sebesar 50%.

4.4.7 Penentuan Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Kulit Batang

Cempedak secara *in vitro*

Pada uji aktivitas *in vitro* digunakan *P. falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap kloroquin. Secara prinsip uji aktivitas dilakukan dengan cara berikut : bahan uji (10 mg untuk ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol dan 1 mg untuk fraksi F1-F6) yang dihasilkan dari proses ekstraksi dan

fraksinasi kulit batang *A. champeden* Spreng dilarutkan dalam 100 µl pelarut DMSO. Kemudian dimasukkan ke dalam lempeng sumur mikro dengan 24 lubang dan dilakukan serial pengenceran sampai diperoleh konsentrasi akhir sebesar 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 µg/ml untuk ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol sedangkan untuk fraksi F1-F6 dibuat konsentrasi 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10 µg/ml. Kemudian ditambahkan suspensi parasit dengan kadar parasitemia 1% dan hematokrit 5%. Setelah inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kultur kemudian dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tipis dengan pewarnaan giemsa 10%. Uji ini dilakukan dua kali replikasi. Selanjutnya dihitung persentase parasitemia dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1000 eritrosit di bawah mikroskop.

4.4.8 Uji Toksisitas

a. Pengujian Toksisitas akut

Dosis Uji toksisitas Akut

Sebagai dosis awal yang digunakan harga tertinggi dari suatu bahan yang dikategorikan sebagai “*relatively harmless*” menurut tabel *Toxicity Rating* (Dorelanko,1995). Dinyatakan bahwa suatu bahan dikatakan praktis tidak beracun jika jumlah bahan uji pada tikus >15 g/kg BB. Kemudian dilakukan penyetaraan dosis dari tikus ke mencit, dan diperoleh dosis sebesar 21 g/kg BB mencit.

Dosis yang digunakan pada mencit 20 g adalah $20/1000 \times 21 \text{ g} = 0,42 \text{ g}$ ekstrak. Dari hasil tersebut dosis diturunkan untuk mendapatkan dosis yang

membunuh mencit kurang dari 50 % tetapi tidak 0 % dan membunuh lebih dari 50 % tetapi tidak 100 % (Ghosh,1971).

Penyiapan Bahan Uji

Pembuatan mucilago CMC Na 0,5 % dengan cara ditimbang 0,5 g CMC Na, ditaburkan diatas air panas secukupnya, dibiarkan mengembang \pm 15 menit. Digerus sampai homogen, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur dan ditambah dengan aquadest sampai 100 ml. Mucilago CMC Na ini diberikan ke kelompok kontrol sebanyak 1 ml secara oral.

Pengumpulan Data Uji Toksisitas Akut

Disiapkan 4 kelompok mencit untuk tiap ekstrak yang masing-masing menerima dosis yang berbeda. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit, untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol, tiap hewan coba diberi ekstrak etanol cempedak sesuai dengan dosis masing-masing. Pemberian dilakukan secara per oral sebanyak satu kali, kemudian dilakukan pengamatan selama 7 hari.

Kelompok I : Sebagai kelompok kontrol, diberi suspensi CMC Na 0,5%

Kelompok II : Diberi ekstrak cempedak dengan dosis tertinggi

Kelompok III : Diberi ekstrak cempedak dengan dosis $\frac{1}{2}$ dosis tertinggi

Kelompok IV : Diberi ekstrak cempedak dengan dosis $\frac{1}{4}$ dosis tertinggi

Analisis Data Uji Toksisitas Akut

Data yang diperoleh dalam penelitian ini diolah dengan menggunakan probit analisis, suatu program komputer yang dibuat untuk menentukan LD_{50} dari ekstrak etanol cempedak yang diuji. Prinsip pengolahan data dari program

ini adalah mengekstrapolasikan dosis bahan uji dengan prosen letalitas (kematian) mencit yang diuji.

b. Pengujian toksisitas sub akut

Dosis Uji toksisitas Subakut

Sebagai dosis awal digunakan dosis pemakaian dalam masyarakat, yaitu kira-kira 7 g simplisia per hari untuk manusia dengan berat badan 50 kg. Jika digunakan untuk manusia dengan berat badan 70 kg, maka simplisia yang digunakan adalah $70/50 \times 7 \text{ g} = 9,8 \text{ g}$. Sedangkan faktor konversi untuk manusia 70 kg ke mencit $20 \text{ g} = 0,0026$, sehingga dosis mencit = $0,0026 \times 9,8 \text{ g} = 25,48 \text{ mg}$ simplisia / mencit. Jadi dosis lazim (DL) adalah berat ekstrak yang setara dengan 25,48 mg simplisia / mencit (20 g) yaitu 1,9017 mg ekstrak.

Penyiapan Bahan Uji

Pembuatan mucilago CMC Na 0,5 % dengan cara ditimbang 0,5 g CMC Na, ditaburkan diatas air panas secukupnya, dibiarkan mengembang ± 15 menit. Digerus sampai homogen, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur dan ditambah dengan aquadest sampai 100 ml. Mucilago CMC Na ini diberikan ke kelompok kontrol sebanyak 1 ml secara oral.

Pengumpulan Data Uji Toksisitas Subakut

Disiapkan 5 kelompok mencit untuk tiap ekstrak yang masing-masing menerima dosis yang berbeda. Masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor mencit, untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol. Tiap hewan coba diberi ekstrak etanol cempedak sesuai dengan dosis masing-masing. Pemberian dilakukan secara per oral sebanyak 1 kali selama 30 hari, kemudian hewan coba dikorbankan diambil hatinya untuk dibuat preparat.

Kelompok I : Sebagai kelompok kontrol, diberi suspensi CMC Na 0,5 %

Kelompok II : Diberi ekstrak cempedak setara dengan dosis lazim

Kelompok III : Diberi ekstrak cempedak dengan 5x dosis lazim

Kelompok IV : Diberi ekstrak cempedak dengan 10x dosis lazim

Analisis Data Uji Toksisitas Subakut

Pemeriksaan Preparat

Pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya agar dapat mengamati secara mikroskopik preparat hati mencit. Mula-mula digunakan perbesaran 100 kali kemudian digunakan perbesaran 400 kali. Setiap preparat hati mencit diamati perubahannya melalui lima lapang pandang yang berbeda.

Pada setiap lapang pandang, diamati perubahan-perubahan yang terjadi. Setiap preparat digeser minimal lima kali lapang pandang kemudian diskor, dijumlah dan dibagi lima, maka hasil dari lima kali pergeseran itu adalah data dari satu preparat. Cara pemberian skor yaitu apabila terjadi perubahan degenerasi kurang dari 50% lapang pandang, maka diberi skor 1 (satu) karena dianggap degenerasi yang terjadi adalah degenerasi ringan. Apabila degenerasi yang terjadi sekitar 50%, dianggap degenerasi yang terjadi adalah degenerasi sedang dan diberi skor 2 (dua). Dikatakan degenerasi berat apabila pada satu lapang pandang terjadi degenerasi lebih dari 50% dan diberi skor 3 (tiga). Bila dalam gambaran histopatologi tersebut terdapat perubahan sampai terjadi nekrosis maka perubahan tersebut ditandai 1 (satu) apabila nekrosis yang terjadi kurang dari 50%, diberi skor 2 (dua) apabila nekrosis yang terjadi kurang lebih 50% dan diberi skor 3 (tiga), apabila nekrosis yang terjadi lebih dari 50% (Sukardja,1998).

Tabel 4.1 Skor perubahan gambaran histopatologi hati mencit

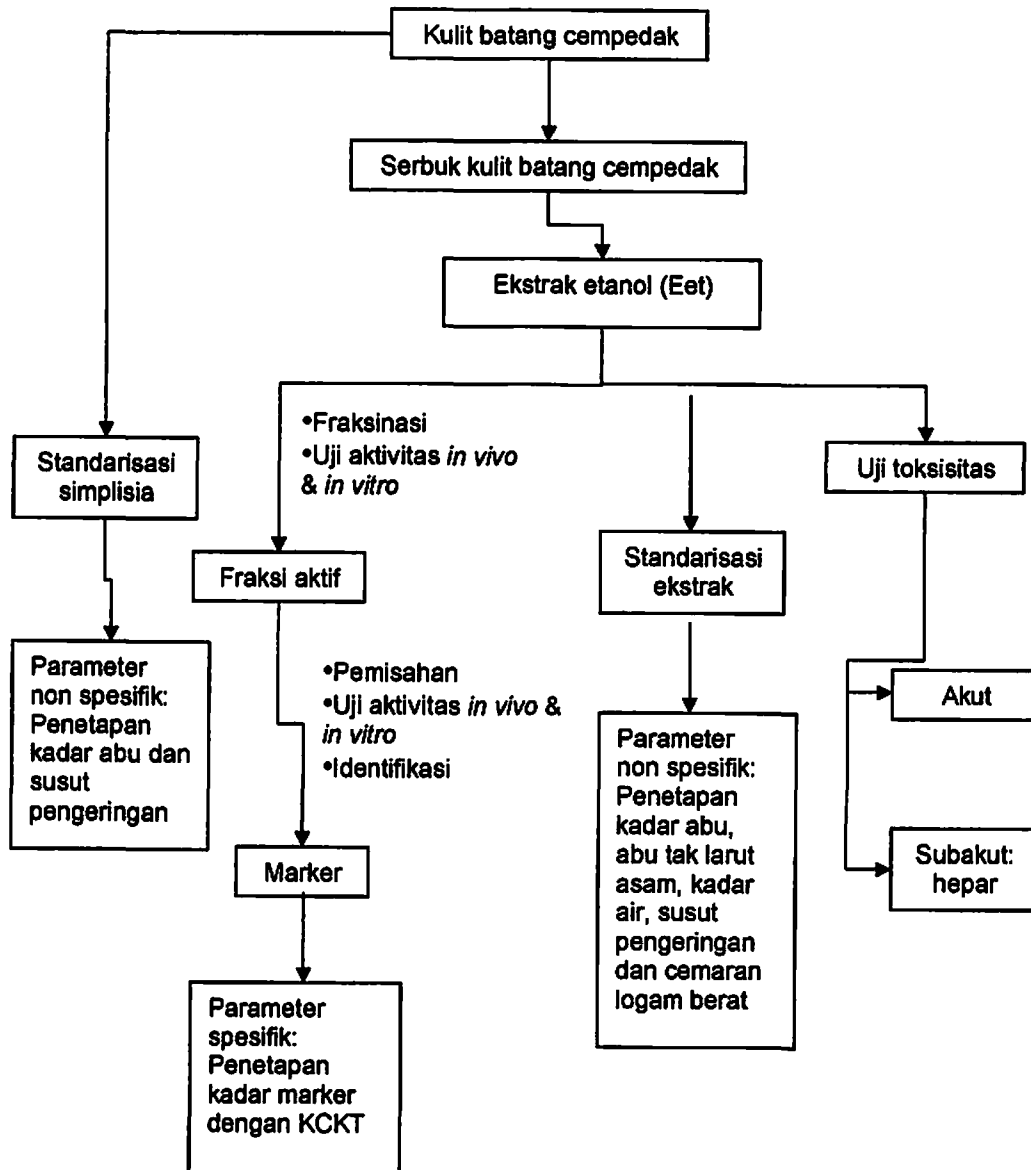
Tingkat Perubahan Gambaran Histopatologi Hati	Skor
Normal	0
Degenerasi Ringan	1
Degenerasi Sedang	2
Degenerasi Berat	3
Nekrosis Ringan	1
Nekrosis Sedang	2
Nekrosis Berat	3

Analisis Data

Data perubahan gambaran histopatologi hati mencit yang telah diberi skor, diolah dengan penilaian peringkat (rank) lalu dianalisis menggunakan Uji Kruskal Wallis. Dipilih Uji Kruskal Wallis karena data diperoleh berdasarkan nilai skoring atau penilaian derajat perubahan. Bila terjadi perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (uji Z) 5% (Daniel, 1990)

Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Cara pembuatannya melalui beberapa tahap sebagai berikut: 1. Fiksasi dengan formalin 10% dilanjutkan pencucian dengan air, 2. Dihidrasi dan clearing, 3. Infiltrasi, 4. Pembuatan blok parafin, 5. Pemotongan blok parafin dengan mikrotom, 6. Pewarnaan dengan menggunakan Hematoxylin Eosin, 7. Pemberian lapisan Kanada balsam pada gelas objek yang telah diwarnai.



Gambar 4.1. Skema Operasional Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penentuan Senyawa Marker

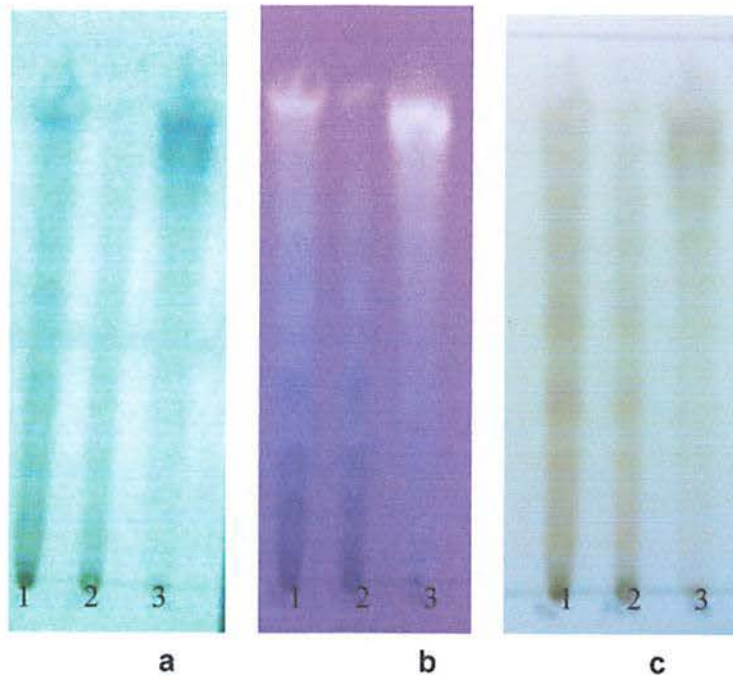
5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi

Hasil ekstraksi dari 1 kg kulit batang cempedak menggunakan pelarut etanol 80% diperoleh ekstrak berwarna coklat kemerahan sebanyak 40 g. Ekstrak etanol ini selanjutnya di ekstraksi kembali berturut-turut menggunakan pelarut etil asetat dan butanol sehingga diperoleh hasil sbb :

Ekstrak/fraksi	Berat	Warna
Ekstrak Etanol (EEt)	40 g	Coklat kemerahan
Fraksi Etil Asetat (FEa)	21,9 g	Coklat kemerahan
Fraksi Butanol (FB)	1,4 g	Coklat

5.1.2 Hasil Identifikasi ekstrak etanol, fraksi etilasetat dan fraksi butanol dengan KLT

Dari hasil identifikasi terhadap ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit batang cempedak dengan KLT densitometri, menggunakan fase gerak CH₃OH : H₂O (4:1), fase diam *reverse phase* RP-18 diperoleh kromatogram sebagai berikut :



Gambar 5.1 Kromatogram hasil KLT dari ekstrak etanol (1), fraksi etil asetat (2) dan fraksi butanol (3), fase gerak gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam *reverse phase* RP-18, dilihat di bawah lampu uv 254 nm (a), 365 nm (b) dan dengan penampak noda H_2SO_4 10% (c).

Dari kromatogram tersebut di atas terlihat bahwa ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol memiliki spot berwarna coklat gelap jika dilihat di bawah lampu uv 254 nm. Jika dilihat di bawah lampu uv 365 nm dan dengan penampak noda H_2SO_4 10% dapat dilihat lebih jelas bahwa ekstrak etanol dan fraksi etil asetat memiliki pola spot yang hampir sama sedangkan fraksi butanol memiliki spot yang dominan pada R_f 0,86. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat berwarna fluoresensi kuning (R_f 0,86), ungu (R_f 0,80-0,40 dan R_f 0,30) dan coklat gelap (R_f 0,42 dan R_f 0,26-0,13) di bawah lampu uv 365 nm dan berwarna kuning-coklat dan orange (R_f 0,42) dengan penampak noda H_2SO_4 10%, sedangkan fraksi butanol berwarna fluoresensi kuning di bawah lampu uv 365 nm dan berwarna coklat dengan penampak noda H_2SO_4 10%. Menurut

Markham (1985) dan Harborne (1987), flavonoid akan memberikan warna yang karakteristik jika diamati dengan sinar uv yaitu fluoresensi kuning, jingga, coklat, biru dan ungu sehingga dari kromatogram tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak dan fraksi kulit batang cempedak mengandung senyawa flavonoid, khususnya ekstrak etanol dan fraksi etil asetat diduga mengandung senyawa khalkon pada Rf 0,42 yang memiliki spot berwarna coklat gelap di bawah lampu uv 365 nm dan berwarna orange dengan penampak noda H₂SO₄ 10%.

5.1.3 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria *in vivo* Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang Cempedak

Hasil uji antimalaria *in vivo* dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol dari kulit batang cempedak pada mencit terinfeksi *P.berghei* dapat dilihat pada tabel 5.1., 5.2 dan 5.3 di bawah ini.

Tabel 5.1. Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium berghei*

Dosis uji	R	%Parasetemia		%Pertumbuhan	%Hambatan	%Hambatan rata-rata
		D0	D4			
100 mg/kg BB	1	3,63	5,69	2,07	86,34	76,70
	2	3,64	6,67	3,03	80,00	
	3	1,54	7,03	5,49	63,76	
10 mg/kg BB	1	2,13	2,27	0,14	99,07	73,48
	2	2,37	4,94	2,57	83,03	
	3	2,24	11,58	9,34	38,35	
1 mg/kg BB	1	3,24	8,91	5,67	62,57	55,11
	2	3,09	10,26	7,17	52,67	
	3	2,27	9,83	7,56	50,10	

Tabel 5.2. Persen pertumbuhan parasetemia dan persen penghambatan fraksi etil asetat kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium berghei*

Dosis uji	R	%Parasetemia		%Pertumbuhan	%Hambatan	%Hambatan rata-rata
		D0	D4			
100 mg/kg BB	1	1,13	7,21	6,08	59,86	57,48
	2	2,10	8,26	6,16	59,34	
	3	2,99	10,07	7,08	53,26	
10 mg/kg BB	1	2,97	11,47	8,50	43,89	47,16
	2	1,05	7,20	6,15	59,40	
	3	1,45	10,81	9,36	38,21	
1 mg/kg BB	1	2,82	9,30	6,48	57,22	46,55
	2	1,80	10,94	9,14	39,67	
	3	2,29	10,96	8,67	42,77	

Tabel 5.3. Persen pertumbuhan parasetemia dan persen penghambatan fraksi butanol kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium berghei*

Dosis	R	%Parasetemia		%Pertumbuhan	%Hambatan	%Hambatan rata-rata
		D0	D4			
100 mg/kg BB	1	2,61	11,94	9,33	38,41	36,54
	2	2,52	12,04	9,53	37,09	
	3	2,38	12,36	9,98	34,12	
10 mg/kg BB	1	3,06	14,26	11,20	26,07	21,25
	2	2,21	13,26	11,05	27,06	
	3	3,24	16,78	13,54	10,62	
1 mg/kg BB	1	3,03	21,01	17,98	0	14,29
	2	2,17	14,94	12,77	15,71	
	3	1,32	14,52	13,20	12,87	
Kontrol (-)	1	3,01	15,91	12,90	-	-
	2	3,21	15,16	11,95	-	
	3	2,16	14,61	12,45	-	
	4	1,60	24,90	23,30	-	

Data pada tabel tersebut di atas menunjukkan bahwa ekstrak etanol mempunyai hambatan parasit 76,70% pada dosis 100 mg, sedangkan fraksi etil asetat 57,48% dan fraksi butanol 36,54 %. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol mempunyai aktivitas antimalaria yang potensial

dibandingkan fraksi etil asetat dan butanol. Berdasarkan perhitungan dengan analisis probit diperoleh nilai ED₅₀ ekstrak etanol sebesar 0,2447 mg/kg BB.

5.1.4 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria *in vitro* Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang Cempedak

Hasil uji antimalaria *in vitro* dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol dari kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium falciparum* dapat dilihat pada tabel 5.4., 5.5 dan 5.6 di bawah ini.

Tabel 5.4 Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium falciparum*

Dosis uji (µg/mL)	R	%Parasetemia		%Pertumbuhan	%Hambatan	%Hambatan rata-rata
		0 jam	48 jam			
Kontrol (-)	1	0,96	6,03	5,07	-	-
	2		5,81	4,85	-	
100	1		0,60	0	100	100
	2		0,64	0	100	
10	1		2,76	1,80	63,71	58,77
	2		3,25	2,29	53,83	
1	1		4,11	3,15	36,49	30,74
	2		4,68	3,72	25,00	
0,1	1		4,66	3,70	25,40	21,17
	2		5,08	4,12	16,94	
0,01	1		5,38	4,42	10,89	9,78
	2		5,49	4,53	8,67	

Tabel 5.5 Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan fraksi etil asetat kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium falciparum*

Dosis uji ($\mu\text{g/mL}$)	R	%Parasitemia		%Pertumbuhan	%Hambatan	%Hambatan rata-rata
		0 jam	48 jam			
Kontrol (-)	1	0,98	6,44	5,46	-	-
	2		6,05	5,07	-	
100	1		1,37	0,39	92,58	91,44
	2		1,49	0,51	90,30	
10	1		1,92	0,94	81,37	82,51
	2		1,84	0,86	83,65	
1	1		6,12	5,14	2,28	2,28
	2		6,65	5,67	0	
0,1	1		6,22	5,24	0,38	0,38
	2		6,60	5,62	0	
0,01	1		6,23	5,25	0,19	0,19
	2		7,03	6,05	0	

Tabel 5.6 Persen pertumbuhan parasitemia dan persen penghambatan fraksi butanol kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium falciparum*

Dosis uji ($\mu\text{g/mL}$)	R	%Parasitemia		%Pertumbuhan	%Hambatan	%Hambatan rata-rata
		0 jam	48 jam			
Kontrol (-)	1	0,98	6,35	5,37	-	-
	2		6,42	5,44	-	
100	1		1,27	0,29	94,63	94,72
	2		1,26	0,28	94,81	
10	1		1,22	0,24	95,55	94,07
	2		1,38	0,40	92,59	
1	1		6,34	5,36	0,74	7,13
	2		5,65	4,67	13,52	
0,1	1		6,44	5,46	0	8,52
	2		5,92	4,94	8,52	
0,01	1		6,01	5,03	6,85	4,72
	2		6,24	5,26	2,59	

Data pada tabel tersebut di atas menunjukkan bahwa fraksi butanol mempunyai hambatan parasit 94,72% pada dosis 100 $\mu\text{g/mL}$, demikian juga dengan fraksi etil asetat 91,44% sedangkan ekstrak etanol 100%. Dengan

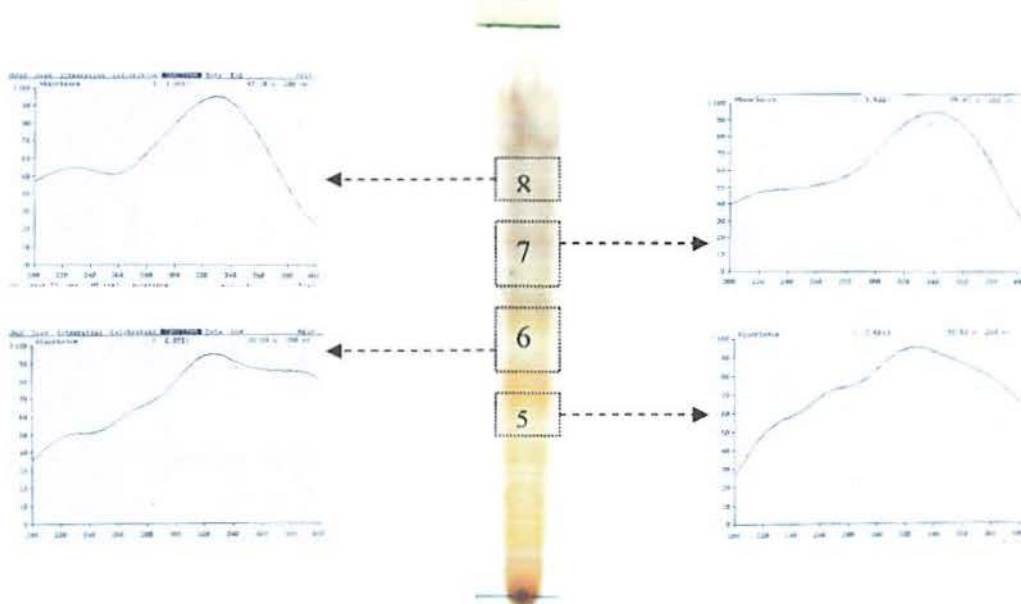
demikian dapat dinyatakan bahwa pada uji antimalaria *in vitro* ekstrak etanol mempunyai aktivitas antimalaria yang potensial dibandingkan fraksi etil asetat dan fraksi butanol. Hal ini juga ditunjukkan dengan nilai IC_{50} dari ekstrak etanol yang lebih kecil dibandingkan fraksi etil asetat dan fraksi butanol, seperti diperlihatkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.7 Hasil analisis probit aktivitas antimalaria ekstrak dan fraksi kulit batang cempedak secara *in vitro*

Ekstrak/fraksi	% Hambatan pada dosis					IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	100	10	1	0,1	0,01	
Ekstrak etanol	100	58,77	30,74	21,17	9,78	1,89830
Fraksi etil asetat	91,44	82,51	2,28	0,38	0,19	5,90401
Fraksi butanol	94,72	94,07	7,13	8,52	4,72	2,35597

5.1.5 Hasil Penentuan Senyawa Marker Pada Ekstrak Aktif (ekstrak etanol)

a. Hasil Identifikasi ekstrak etanol dengan KLT densitometri

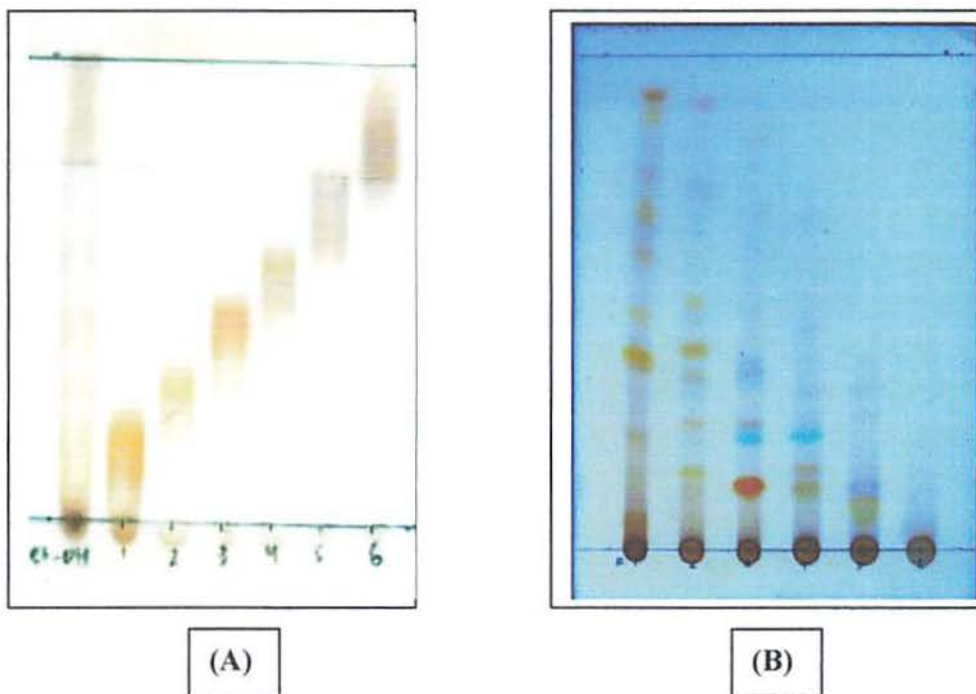


Gambar 5.2 Kromatogram hasil KLT dari ekstrak etanol, fase gerak gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam *reverse phase* RP-18, penampak noda H_2SO_4 10%; dan spektrum serapan beberapa spot pada panjang gelombang 365 nm secara densitometri.

Dari kromatogram tersebut di atas terlihat bahwa ekstrak etanol memiliki spot berwarna oranye yang sangat intensif pada Rf 0,42. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa spot tersebut merupakan spot senyawa flavonoid yang dapat dijadikan senyawa penanda (marker) bagi ekstrak etanol kulit batang cempedak ini.

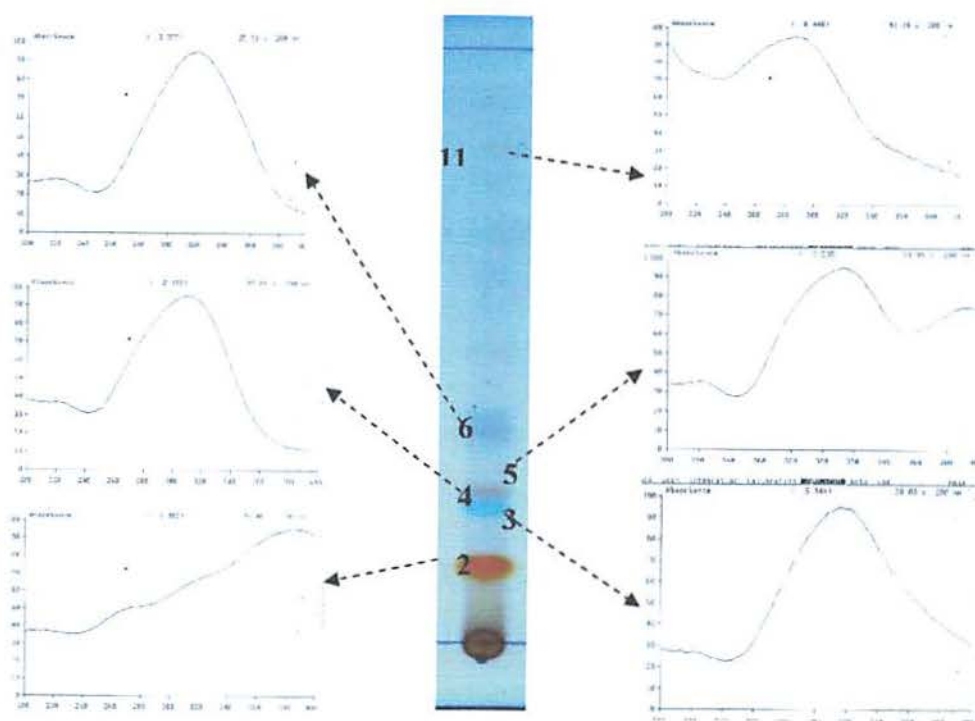
b. Hasil fraksinasi ekstrak etanol kulit batang cempedak

Selanjutnya terhadap ekstrak aktif, yaitu ekstrak etanol dilakukan fraksinasi dengan KLT-Preparatif menggunakan fase gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam *reverse phase* RP-18, dan diperoleh 6 fraksi. Kromatogram hasil fraksinasi adalah sebagai berikut :



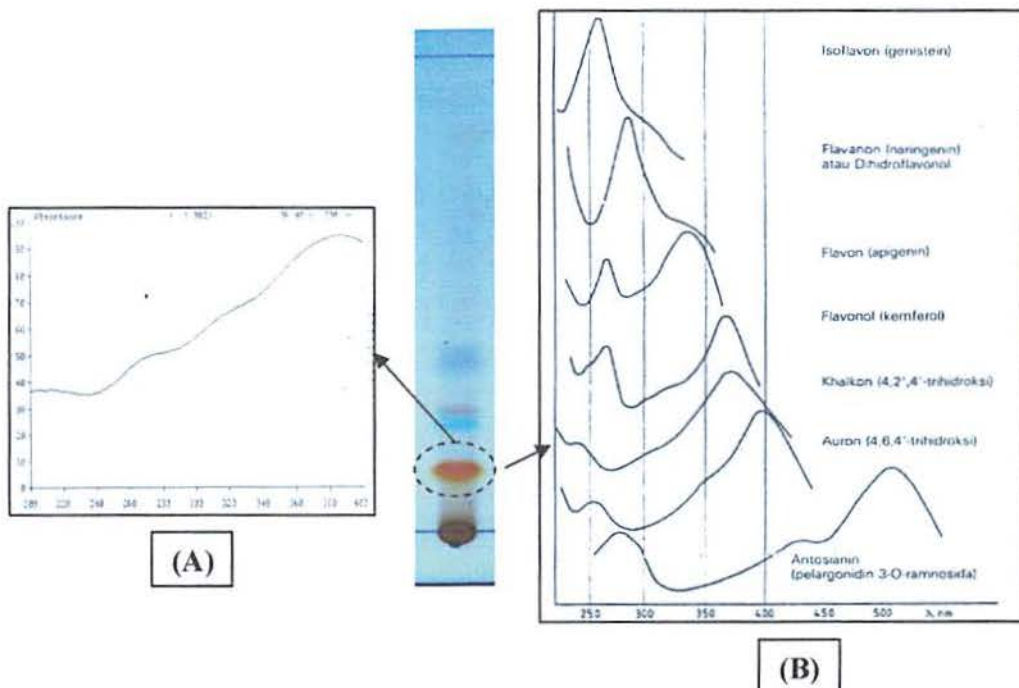
Gambar 5.3 Kromatogram hasil KLT preparatif dari ekstrak etanol (EtOH) ekstrak etanol, (1) fraksi F1, (2) fraksi F2, (3) fraksi F3, (4) fraksi F4, (5) fraksi F5, (6) fraksi F6, (A) : fase gerak gerak $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1), fase diam *reverse phase* RP-18, (B) : fase gerak $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$ 5%, fase diam silica gel; penampak noda H_2SO_4 10%.

Fraksi F3 pada gambar kromatogram di atas (A), menunjukkan spot warna oranye pada harga $R_f = 0,42$ telah berhasil dipisahkan dari spot lainnya. Pada kromatogram (B), terlihat bahwa F3 masih merupakan fraksi yang belum murni karena pada KLT masih menunjukkan beberapa spot. Pada kromatogram (B) dimana fase gerak dan fase diam berbeda dengan kromatogram (A), spot warna oranye pada fraksi F3 dengan nilai $R_f = 0,13$ terlihat terpisah dari spot lainnya. Selanjutnya F3 diidentifikasi menggunakan KLT-densitometri untuk melihat profil dari masing-masing spot. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.4 Kromatogram KLT dan spektrum serapan densitometri fraksi F3, fase gerak $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 5% dan fase diam silika gel

Pada uji kualitatif menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel dan fase gerak $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 5% dan penampak noda H_2SO_4 10%, menunjukkan bahwa fraksi F3 memberikan beberapa spot yang berwarna oranye (spot nomor 2), biru (nomor 3 dan 5) dan ungu (nomor 4 dan 6), yang merupakan karakteristik dari senyawa flavonoid. Hasil identifikasi dengan KLT-Densitometri menggunakan fase gerak dan fase diam yang sama juga menunjukkan bahwa spot tersebut memberikan spektrum senyawa flavonoid. Khususnya spot nomor 2 yang berwarna oranye dengan nilai R_f 0,13 memberikan gambaran spektrum senyawa khalkon dengan $\lambda = 240 - 380$ nm. Menurut Markham (1985), senyawa khalkon memberikan serapan pada $\lambda = 200-400$ nm, seperti terlihat pada Gambar 5.5. Untuk memastikannya perlu dilakukan isolasi dan elusidasi struktur terhadap spot nomor 2 tersebut.



Gambar 5.5 Identifikasi spektrum serapan densitometri fraksi F3 spot 2 (A) dengan berbagai senyawa flavonoid (B) yang dikutip dari Markham (1985)

c. Hasil uji antimalaria *in vitro* dari fraksi F3 ekstrak etanol kulit batang cempedak

Hasil uji antimalaria dari F3 *in vitro* terhadap *P. falciparum* dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.8 Persen parasitemia dan persen penghambatan fraksi F3 ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium falciparum*

Dosis uji ($\mu\text{g/mL}$)	R	% Parasetemia	% Hambatan	% Hambatan rata-rata
		48 jam		
Kontrol (-)	1	7,34	-	-
	2	6,55	-	
10	1	2,01	71,04	66,35
	2	2,66	61,67	
1	1	5,18	25,36	26,08
	2	5,08	26,80	
0,1	1	5,53	20,32	19,67
	2	5,62	19,02	
0,01	1	6,06	12,68	16,50
	2	5,46	21,32	
0,001	1	5,55	20,02	16,56
	2	6,03	13,11	

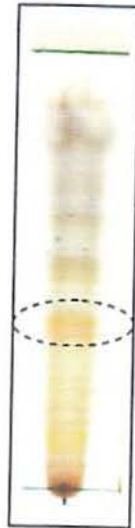
Data pada tabel tersebut diatas menunjukkan bahwa fraksi F3 ekstrak etanol mempunyai hambatan parasit 66,35% pada dosis 10 $\mu\text{g/mL}$. Dibandingkan dengan fraksi lainnya yaitu fraksi F1, F2, F4, F5, dan F6 yang masing-masing mempunyai hambatan parasit 55,55%, 34,98%, 56,41%, 70,95% dan 17,72% (Lampiran 1), fraksi F3 dan F5 memberikan hambatan pertumbuhan terhadap *P.falciparum* yang cukup besar. Suatu bahan/bahan obat yang memberikan hambatan pertumbuhan parasit lebih dari 50% dapat dinyatakan prospektif sebagai antimalaria. Sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi F3 dan F5 merupakan fraksi aktif antimalaria. Oleh karena itu senyawa pada spot 2 pada fraksi aktif F3 ini dapat dijadikan target sebagai senyawa marker, juga dikarenakan spot 2 ini juga teridentifikasi pada ekstrak etanol. Selanjutnya perlu

dilakukan isolasi dan identifikasi terhadap senyawa ini untuk mengetahui struktur senyawanya secara pasti.

5.2 Hasil Isolasi Senyawa Marker

5.2.1 Hasil Ekstraksi

Hasil ekstraksi dari 1 kg kulit batang cempedak menggunakan pelarut etanol 80% diperoleh ekstrak berwarna coklat kemerahan sebanyak 40 g. Kromatogram hasil KLT ekstrak etanol dapat dilihat pada gambar di bawah ini. Senyawa marker teridentifikasi pada ekstrak etanol sebagai spot orange intensif dengan Rf 0,42.

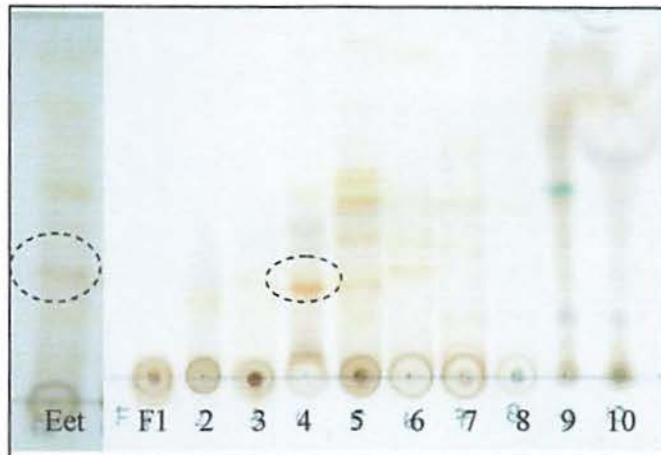


Gambar 5.6. Kromatogram hasil KLT ekstrak etanol dengan fase diam RP-18, fase gerak MeOH:air (4:1 v/v), dan penampak noda H₂SO₄

5.2.2 Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol

Terhadap 11 g ekstrak etanol dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam ODS Cosmosil 140 C18 dan fase gerak berturut-turut metanol:air (4:1v/v), metanol, metanol:asetonitril (1:1v/v), dan asetonitril

diperoleh 10 fraksi. Kromatogram hasil KLT dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

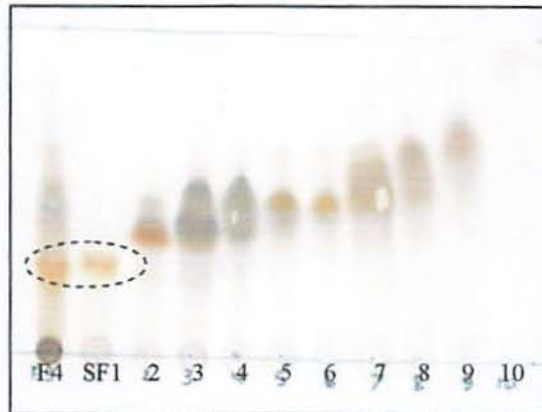


Gambar 5.7. Kromatogram hasil KLT dari fraksi 1-10 hasil pemisahan ekstrak etanol. Fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak kloroform:metanol (9:1v/v), dan penampak noda H₂SO₄ 10%.

Pada uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* yang telah dilakukan terhadap fraksi hasil pemisahan ekstrak etanol yang mengandung spot orange intensif pada R_f 0,28 menunjukkan bahwa fraksi tersebut menghambat pertumbuhan *P.falciparum* dengan nilai IC₅₀ 6,69797 µg/mL sedangkan fraksi 4 mengandung spot orange intensif sehingga fraksi 4 dapat dinyatakan sebagai fraksi aktif.

5.2.3 Hasil Subfraksinasi

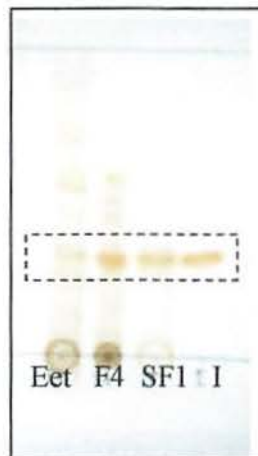
Terhadap fraksi aktif (466 mg) dilakukan pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan fase diam silika gel, fase gerak kloroform:metanol 10% diperoleh 10 subfraksi. Senyawa marker teidentifikasi pada SF 1 dengan R_f 0,28. Kromatogram hasil KLT dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.8. Kromatogram hasil KLT subfraksi 1-10 hasil pemisahan fraksi 4. Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak kloroform:metanol (9:1v/v), dan penampak noda H_2SO_4 10%.

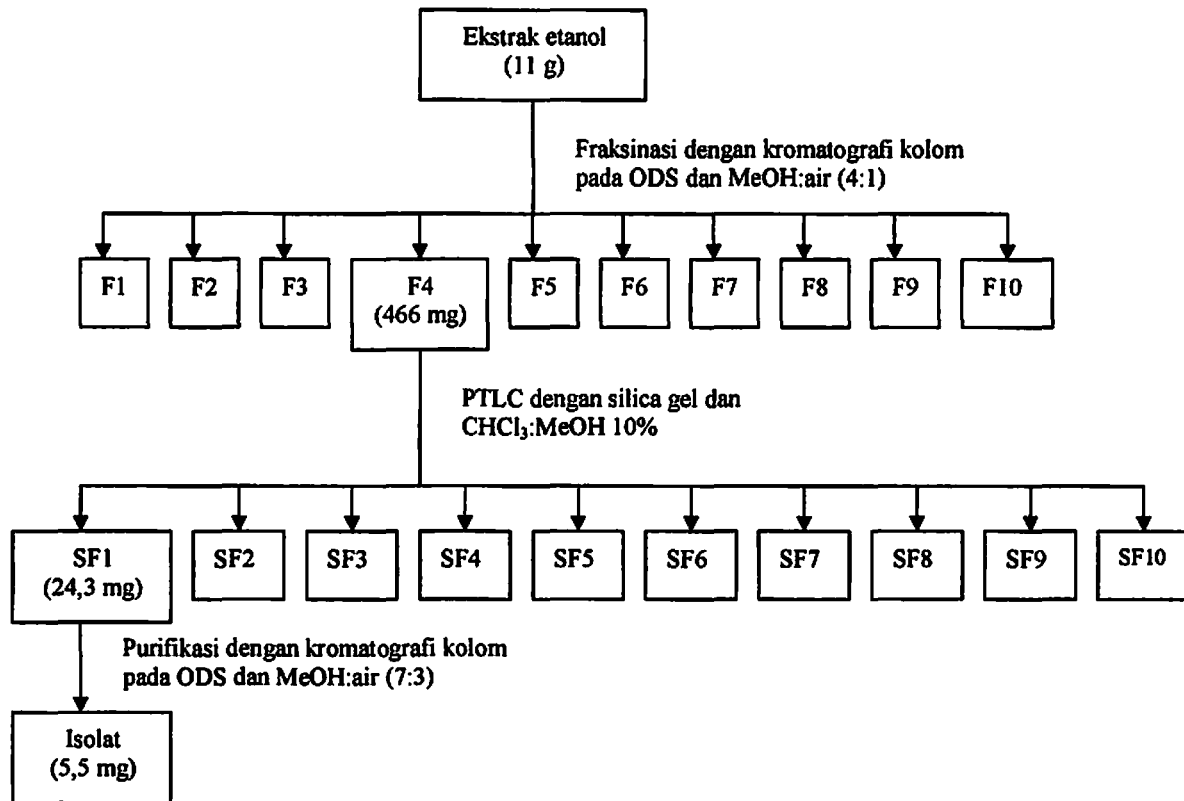
5.2.4 Hasil Pemurnian Subfraksi

Terhadap subfraksi 1 (24,3 mg) dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan menggunakan fase diam ODS Cosmosil 140 C18 dan fase gerak metanol:air (7:3 v/v). Diperoleh isolat berwarna kuning sebanyak 5,5 mg. Kromatogram hasil KLT ekstrak etanol, fraksi 4, subfraksi 1 dan isolat (marker) dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.9. Kromatogram hasil KLT ekstrak etanol (Eet), fraksi 4 (F4), subfraksi 1 (SF1) dan isolat (I). Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak kloroform:metanol (9:1v/v), dan penampak noda H_2SO_4 10%.

Tahapan isolasi marker ekstrak etanol kulit batang cempedak dapat dilihat pada gambar di bawah ini:

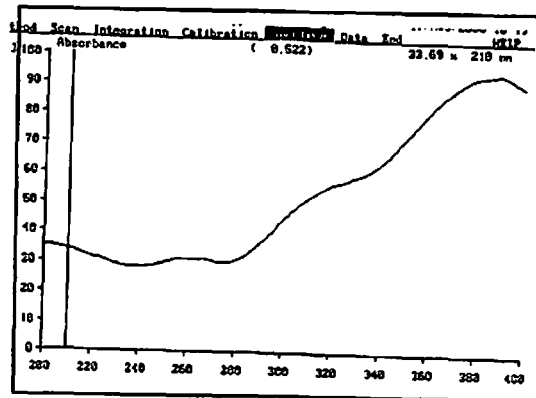


Gambar 5.10. Skema isolasi marker ekstrak etanol *Artocarpus champeden*

5.2.5 Identifikasi marker

1. Identifikasi dengan KLT densitometri

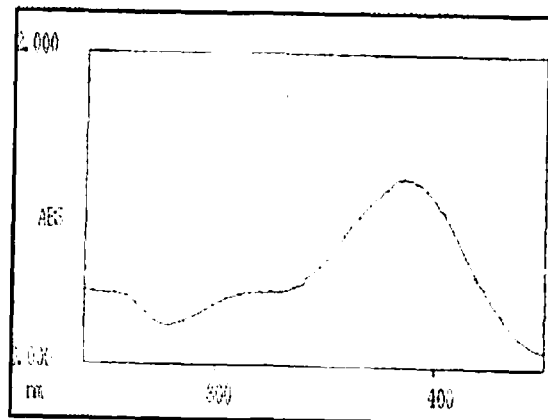
Dilakukan identifikasi terhadap senyawa marker secara KLT densitometri dengan fase diam silika gel F_{254} , fase gerak kloroform:metanol (9:1v/v) untuk menentukan spektrum serapan senyawa. Hasil spektrum serapan senyawa marker dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.11. Spektrum serapan isolat secara KLT densitometri.

2. Identifikasi dengan spektrofotometer uv vis

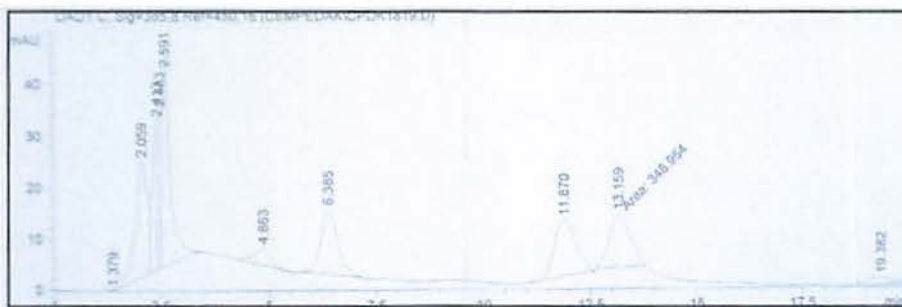
Dilakukan identifikasi terhadap senyawa marker secara spektrofotometri uv vis. Sejumlah kecil senyawa marker dilarutkan dalam metanol kemudian ditentukan spektrum serapan pada panjang gelombang 240-440 nm. Spektrum serapan senyawa marker secara spektrofotometri uv vis dapat dilihat pada gambar di bawah ini. Pada spektrum uv vis senyawa marker tersebut dapat diamati tiga λ_{\max} yaitu 260 nm, 320 nm dan 380 nm.



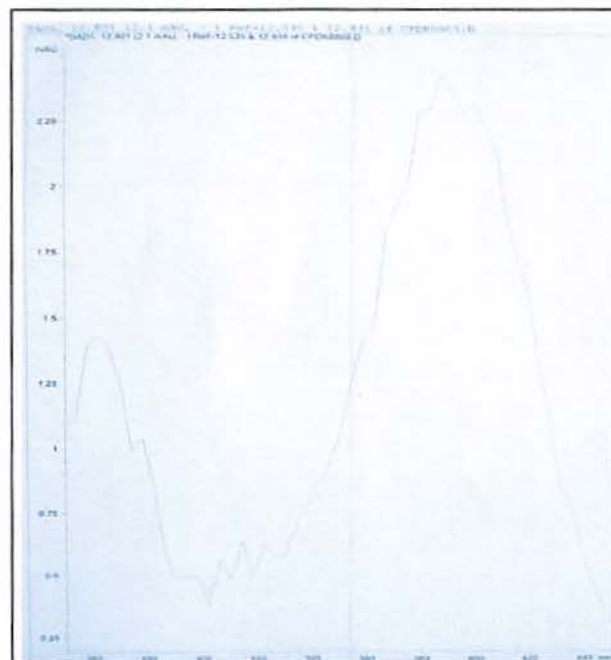
Gambar 5.12. Spektrum uv vis isolat kulit batang *A. champeden*

3. Identifikasi dengan KCKT

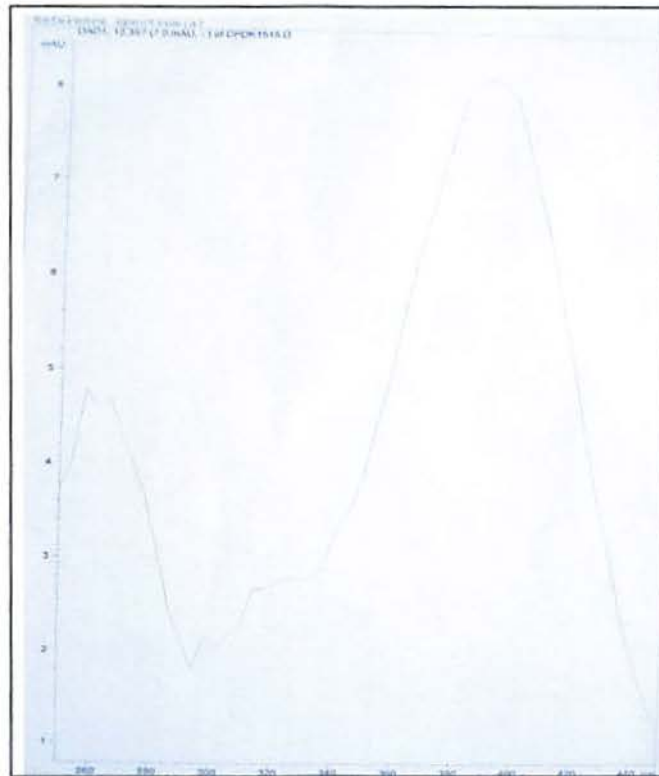
Profil kromatogram dan spektrum serapan ekstrak etanol, fraksi 4, subfraksi 1 dan isolat kulit batang *Artocarpus champeden* dengan KCKT menggunakan KCKT Agilent 1100, kolom Microsorb RP-18, suhu kolom 30°C, fase gerak metanol : air (65:35 v/v) selama 20 menit, kecepatan alir fase gerak 1 ml/menit dan dideteksi pada λ 385 nm, dapat dilihat pada gambar kromatogram di bawah ini.



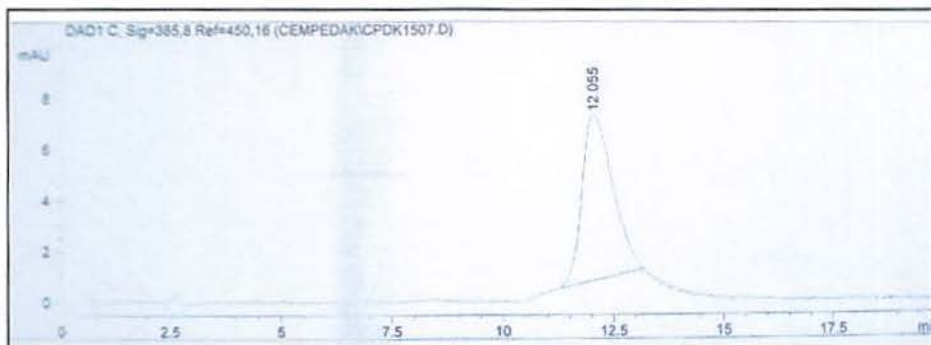
Gambar 5.13. Profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang *Artocarpus champeden* dengan KCKT Agilent 1100



Gambar 5.14. Spektrum serapan puncak dengan Rt 13,159 menit pada kromatogram ekstrak etanol



Gambar 5.15. Spektrum serapan puncak dengan Rt 12,055 menit pada kromatogram isolat hasil purifikasi subfraksi 1



Gambar 5.16. Profil kromatogram isolat hasil purifikasi subfraksi 1 dengan KCKT Agilent 1100

Pada spektrum uv vis isolat tersebut dapat diamati tiga λ_{\max} yaitu 260 nm, 320 nm dan 380 nm. Menurut Markham (1988), flavonoid golongan khalkon secara umum mempunyai spektrum serapan uv vis pada rentang 230-270 nm dan 340-390 nm, sehingga berdasarkan spektrum uv vis kemungkinan

isolat hasil purifikasi subfraksi 1 yang potensial dijadikan marker untuk ekstrak etanol kulit batang cempedak termasuk dalam golongan khalkon.

5.3 Penetapan Parameter Non Spesifik Simplisia

5.3.1. Uji Makroskopik Simplisia

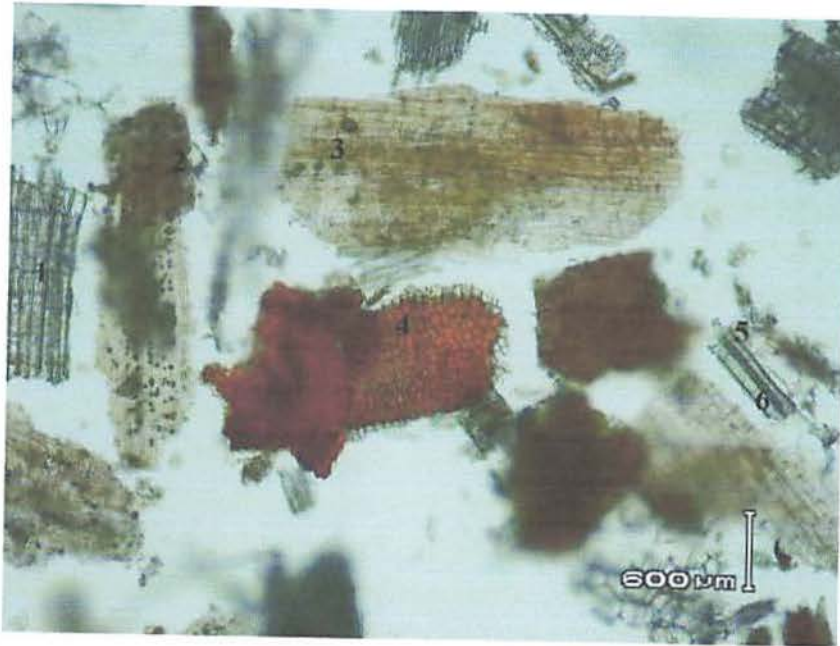
Simplisia kulit batang cempedak berupa potongan kayu, kedua ujung umumnya tidak rata, warna kuning muda dengan garis-garis membujur berwarna kecoklatan, ada penebalan kayu berwarna coklat tua, tidak mudah dipatahkan



Gambar 5.17. Irisan kulit batang cempedak

5.3.2. Identifikasi serbuk

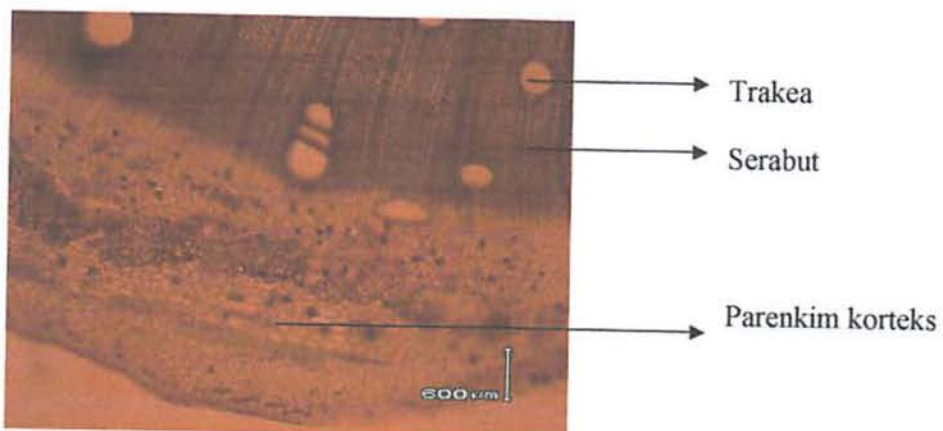
Serbuk kulit batang cempedak berwarna kuning kecoklatan, tidak berbau dan tidak berasa. Hasil uji mikroskopik serbuk kulit batang cempedak dan irisan melintang batang cempedak dapat dilihat pada gambar 5.18 dan 5.19 berikut ini :



Gambar 5.18 Mikroskopis serbuk kulit batang

Keterangan gambar :

- (1) serabut dengan jari-jari teras
- (2) parenkim xylem bernoktah
- (3) serabut
- (4) trakea
- (5) pembuluh kayu penebalan jala
- (6) pembuluh kayu penebalan tangga



Gambar 5.19 Irisan melintang batang cempedak

Tabel 5.9 Hasil pengamatan mikroskopis batang cempedak

No	Susunan	Uraian
1	Empulur	Terdiri atas sel besar berbentuk poligonal
2	Pembuluh kayu	Terdiri dari serabut kayu, pembuluh kayu bernoktah dengan pelebaran jala dan tangga, dengan trakea besar dan lebar, trakea berkelompok atau tunggal
3	Korteks	Terdiri atas beberapa lapis sel

5.3.3. Penetapan Kadar Abu

Pada penetapan kadar abu, langkah awal yang harus dilakukan adalah krus silikat atau platina yang akan digunakan dipijarkan terlebih dahulu dan ditimbang sampai bobot konstan. Hasil penimbangan krus dapat dilihat pada tabel 5.10 dibawah ini.

Tabel 5.10. Penimbangan krus pada penetapan kadar abu

Krus	Berat krus (g)		
	1	2	Konstan
K1	19,6276	19,6278	19,6277
K2	21,3078	21,3080	21,3079
K3	16,8013	16,8013	16,8013
K4	19,2625	19,2624	19,2625
K5	22,7032	22,7031	22,7032

Pada tabel 5.10 dapat dilihat bahwa penetapan kadar abu dilakukan dengan 5 replikasi (K1-K5) dan bobot krus konstan setelah dipijar sebanyak 3 kali. Kemudian simplisia ditimbang dalam krus sebanyak 2-3 gram, selanjutnya dipijar dan ditimbang hingga bobot konstan setelah didinginkan terlebih dahulu. Hasil penimbangan simplisia dapat dilihat pada tabel 5.11 dibawah ini.

Tabel 5.11. Penimbangan simplisia kulit batang cempedak pada penetapan kadar abu

No	Berat simplisia (g)				Berat simplisia awal (g)	Kadar abu (%)
	1	2	3	Konstan (a)	(b)	(a)/(b)x100%
K1	0,1651	0,1721	0,1721	0,1721	2,0009 g	8,60
K2	0,1682	0,1791	0,1791	0,1791	2,0011 g	8,95
K3	0,1636	0,1720	0,1720	0,1720	2,0009 g	8,59
K4	0,1658	0,1709	0,1709	0,1709	2,0007 g	8,54
K5	0,1636	0,1708	0,1708	0,1708	2,0003 g	8,54
					Rerata	8,644%
					SD	0,16
					KV	1,85%

Pada tabel 5.11 dapat dilihat bahwa berat simplisia yang ditimbang rata-rata sebanyak 2 gram dan setelah dipijar 2-3 kali dapat diperoleh bobot konstan. Setelah diperoleh bobot konstan, dihitung kadar abu dalam persen dengan cara membandingkan bobot simplisia setelah dipijar (a) dengan bobot simplisia awal (b).

Berdasarkan hasil penetapan kadar abu, diperoleh nilai kadar abu simplisia kulit batang cempedak sebesar 8,644 % \pm 0,16 dengan nilai KV sebesar 1,85%. Berdasarkan Materia Medika Indonesia nilai kadar abu yang dipersyaratkan untuk simplisia kulit batang cempedak tidak lebih dari 5%. Kadar abu yang di luar persyaratan mungkin dikarenakan simplisia masih mengandung banyak pengotor, pencucian simplisia tidak terlalu bersih.

5.3.4. Penetapan Susut Pengeringan

Tabel 5.12. Penimbangan krus dan simplisia pada penetapan susut pengeringan simplisia serbuk kulit batang cempedak

Krus	Berat krus (g)			Berat simplisia awal (g) (a)	Berat simplisia akhir (g)			Susut pengeringan (%b/b) (a-b)/b x 100%
	1	2	Konstan		1	2	Konstan (b)	
K1	20,6282	20,6282	20,6282	1,0004	0,9111	0,9115	0,9114	8,90%
K2	21,1385	21,1383	21,1384	1,0008	0,9106	0,9080	0,9080	9,27 %
K3	22,3087	22,3088	22,3088	1,0007	0,9122	0,9104	0,9104	9,03%
							Rerata	9,07%
							SD	0,19
							KV	2,09%

Berdasarkan hasil penetapan susut pengeringan, didapatkan hasil susut pengeringan simplisia kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden Spreng*) sebesar 9,07 % ± 0,19.

5.4. Penetapan Parameter non spesifik Ekstrak Etanol 80%

5.4.1. Penetapan Kadar Abu

Tabel 5.13 Hasil Penetapan Kadar Abu

No	Berat Ekstrak (g) (a)			Berat Ekstrak Awal (g) (b)	Kadar abu a/b x 100%
	1	2	Konstan		
A	0,0640	0,0640	0,0640	2,0114	3,2 %
B	0,0703	0,0704	0,0704	2,0112	3,5 %
C	0,0644	0,0646	0,0646	2,0115	3,2 %
D	0,0649	0,0649	0,0649	2,0003	3,2 %
E	0,0629	0,0629	0,0629	2,0007	3,1 %
F	0,0593	0,0593	0,0593	2,0004	3,0 %
Rata- rata					3,2 %
SD					0,2
KV					6,2 %

Penetapan kadar abu dilakukan dengan memanaskan ekstrak pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya tereduksi dan menguap sehingga timbul unsur mineral dan organik. Penetapan ini bertujuan untuk menetapkan kandungan mineral yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Kadar abu total ekstrak etanol adalah $3,2 \% \pm 0,2 \%$, hasil ini merupakan hasil penetapan karena batas nilai kadar abu pada kulit batang cempedak belum tercantum pada literatur.

5.4.2. Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam (Depkes, 2000)

Tabel 5.14 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

No	Berat konstan (g) (a)			Berat ekstrak awal (g) (b)	Kadar abu $a/b \times 100\%$
	1	2	konstan		
A	0,0089	0,0087	0,0088	2,0114	0,43 %
B	0,0086	0,0086	0,0086	2,0112	0,43 %
C	0,0098	0,0098	0,0098	2,0115	0,48 %
Rata- rata					0,45 %
SD					0,03
KV					6,46 %

Penetapan kadar abu yang tidak larut asam dilakukan dengan cara melarutkan abu hasil penetapan kadar abu (bobot konstan) dalam larutan asam klorida yang dipanaskan kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu dan residunya dipijar sampai mencapai bobot konstan. Penetapan kadar abu bertujuan untuk mengetahui kandungan mineral yang toksik. Kadar abu yang tidak larut dalam asam ekstrak etanol adalah $0,45 \% \pm 0,03$.

5.4.3. Penetapan kadar air (Depkes, 2000)

Tabel 5.15 Penetapan Kadar Air

No	Jumlah air (g) (a)	Berat ekstrak (g) (b)	Kadar Air (a/b x 100%)
A	0,8	5,0052	15,98 %
B	0,8	5,0038	15,99 %
C	0,75	5,0068	14,98 %
Rata- rata			15,65 %
SD			0,58
KV			3,7 %

Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan metode titrasi, destilasi, atau gravimetri. Dalam penelitian ini digunakan metode destilasi karena pelaksanaannya lebih mudah dan dapat memperoleh hasil yang teliti. Kadar air pada ekstrak etanol yang diperoleh adalah 15,65 % ± 0,58.

5.4.4. Penetapan susut pengeringan (Depkes, 2000)

Tabel 5.16 Penimbangan Krus Porselen dan Berat Ekstrak Awal

Krus	Berat kurs porselen (g)			Berat ekstrak awal (g)
	1	2	Konstan	
A	32,0602	32,0602	32,0602	1,0060
B	32,7192	32,7192	32,7192	1,0060
C	33,5227	33,5227	33,5227	1,0060

Tabel 5.17 Penimbangan Ekstrak yang Dipijar

No	Berat Zat (g)									konstan
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A	0,8597	0,9176	0,9125	0,9038	0,8985	0,8969	0,8928	0,8892	0,8888	0,8886
B	0,9276	0,9062	0,9024	0,8930	0,8877	0,8859	0,8799	0,8776	0,8774	0,8774
C	0,9162	0,8988	0,8963	0,8867	0,8859	0,8799	0,8742	0,8719	0,8717	0,8715

Tabel 5.18 Penetapan Susut Pengerinan Ekstrak

No. krus	%b/b
A	11,67 %
B	12,77 %
C	13,36 %
Rata-rata	12,6 %
SD	0,86
KV	6,8 %

Penentuan susut pengerinan merupakan pengukuran sisa zat setelah pengerinan pada suhu 105°C selama 1 jam sehingga bobot konstan. Dari penentuan susut pengerinan ini bisa diketahui berat kering ekstrak yang menunjukkan batas minimal tentang besarnya kandungan air ataupun senyawa yang mudah menguap pada ekstrak, hal ini dapat digunakan sebagai parameter kestabilan dan untuk mengetahui besarnya bobot kering ekstrak uji. Besar susut pengerinan ekstrak dalam penelitian ini adalah 12,6 % ± 0,86. Dalam hal ini, berarti batas kandungan air untuk ekstrak etanol sebesar 12,6 %.

5.4.5. Penetapan kadar cemaran logam berat (Depkes, 2000)

Tabel 5.19 Penetapan Kadar Logam Berat

No	Parameter	Replikasi			Rata-Rata (mg/kg)	Persyaratan*(mg/kg)
		I(ppm)	II(ppm)	III(ppm)		
1	Timbal (Pb)	0,128	0,146	0,139	0,138	10
2	Kadmium (Cd)	0,139	0,145	0,133	0,139	0,3
3	Tembaga (Cu)	0,567	0,603	0,614	0,595	150
4	Merkuri (Hg)	-	-	-	-	0,5
5	Arsen (As)	-	-	-	-	5

*pustaka Quality Control Methodes for Medicinal Plants Materials, WHO 1998

Pada penelitian ini juga dilakukan penetapan kadar logam berat yang ada pada ekstrak, meliputi Cu, Pb, Cd, Hg, As. Dengan menggunakan AAS, diperoleh kadar Pb dalam ekstrak sebesar 0,138 mg/kg, sedangkan persyaratannya kurang dari 10 mg/kg. Demikian juga kadar Cu dalam ekstrak 0,595 mg/kg, yang dipersyaratkan tidak lebih dari 150 mg/kg. Kadar Hg dan As tidak terdeteksi (nilainya dibawah LOD), sementara dipersyaratkan kadar Hg tidak boleh dari 0,5 mg/kg dan kadar As tidak boleh dari 5 mg/kg. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol memenuhi batas kadar logam berat yang ditetapkan WHO.

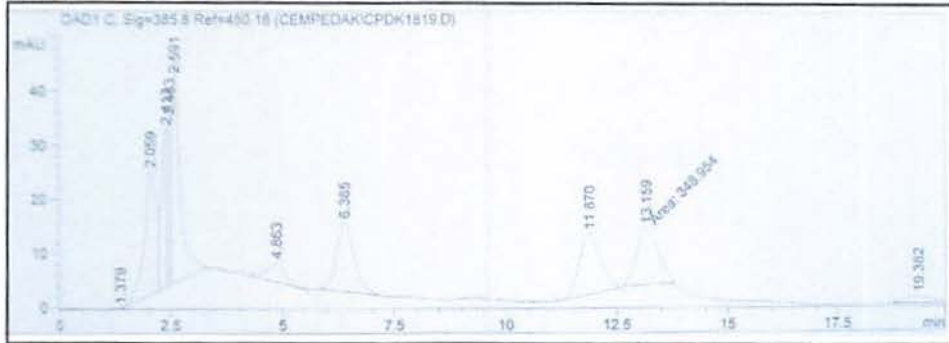
5.5 Penetapan Standar Ekstrak Aktif terhadap Parameter Kadar Senyawa Khalkon

5.5.1. Validasi Metode

1. Parameter Selektivitas

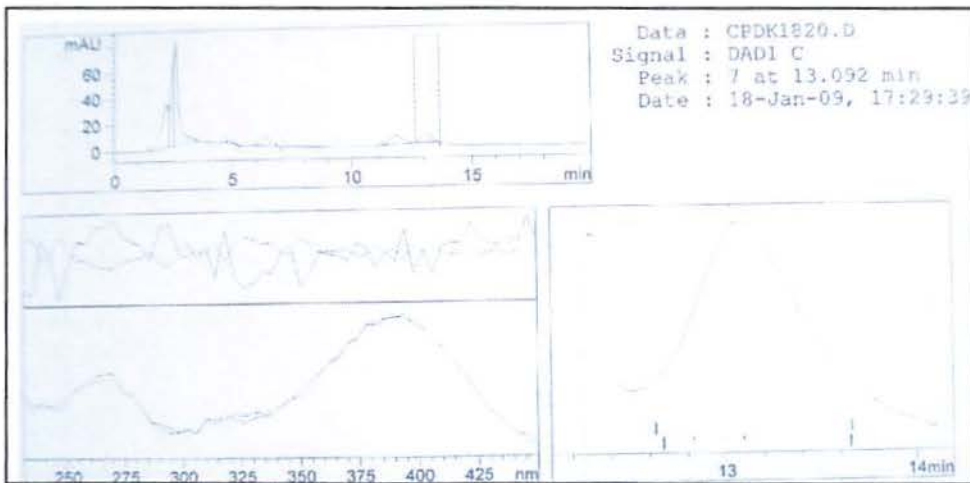
Penentuan selektivitas dilakukan untuk menentukan fase gerak terpilih, dimana senyawa khalkon yang dianalisis dalam ekstrak kulit batang cempedak dapat terpisah baik dari senyawa-senyawa lain yang ada dalam ekstrak. Oleh karena itu, nilai resolusi antara analit dengan senyawa lain seharusnya lebih dari 1,5-2. Disamping itu, untuk mendeteksi adanya koelusi senyawa lain, kemurnian dari puncak senyawa khalkon yang dianalisis juga harus ditentukan dengan melihat nilai *purity factor*, dimana suatu peak dikatakan murni jika nilai *purity factor* > 0,9500 (> 950,000). Untuk penentuan identitas puncak, maka spektrum dari senyawa khalkon dengan ekstrak harus ditentukan dengan melihat nilai *match factor* (MF). Lebar setengah puncak juga berguna dalam menentukan kemurnian dari puncak analit. Berdasarkan hasil optimasi yang dilakukan dapat

ditentukan fase gerak terpilih untuk ekstrak dan standar adalah metanol-air (65:35 v/v). Optimasi fase gerak dilakukan pada panjang gelombang maksimum yaitu 385 nm.



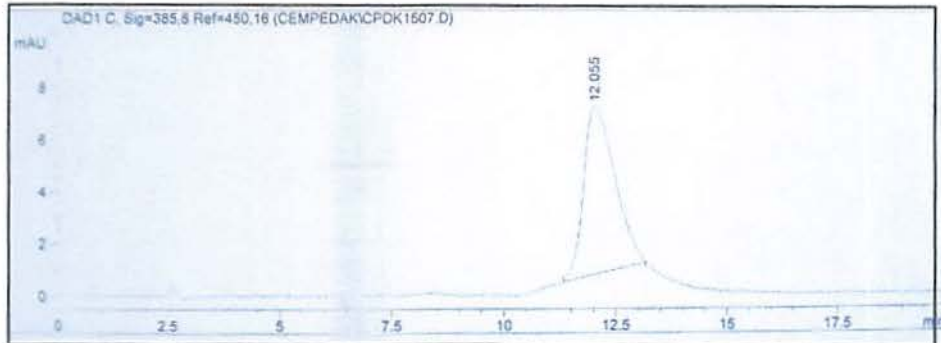
Gambar 5.20 Profil kromatogram hasil KCKT Agilent 1100 ekstrak etanol (Eet) dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18

Berdasarkan kromatogram diatas, senyawa khalkon yang dianalisis pada ekstrak memiliki waktu retensi sekitar 13 menit (puncak nomor 9). Pada ekstrak, puncak nomor 9 diketahui memiliki resolusi sebesar 1,42, *plate number* 3524, lebar setengah puncak 0,5200 dan selektivitas 1,11.

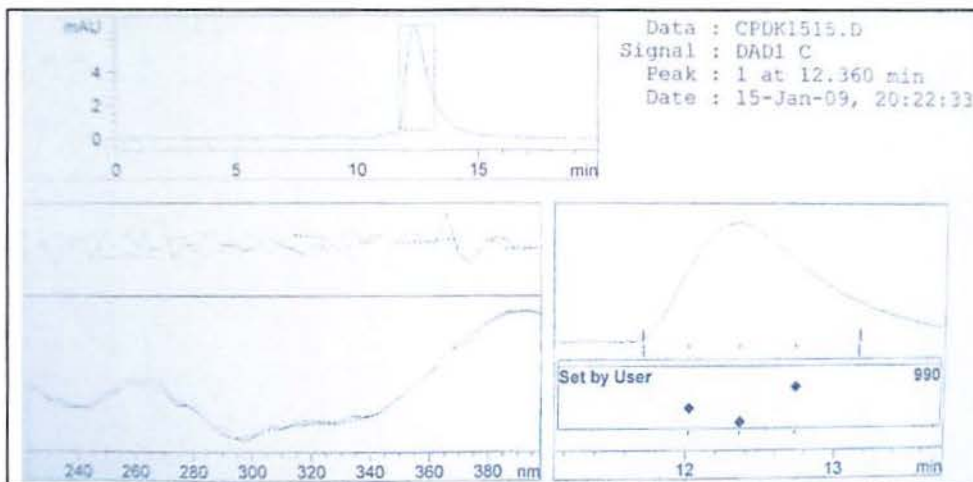


Gambar 5.21 Profil kemurnian puncak dengan waktu retensi 13,092 menit dari kromatogram ekstrak etanol (Eet) yang dielusi dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18

Nilai *purity factor* dari puncak senyawa yang dianalisis adalah 997,034 sehingga dapat dikatakan bahwa puncak senyawa yang dianalisis memenuhi syarat kemurnian.



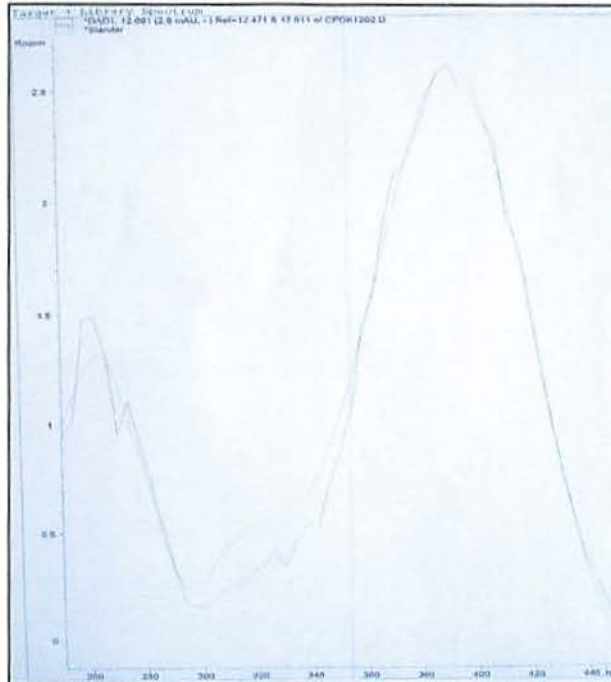
Gambar 5.22 Profil kromatogram hasil KCKT Agilent 1100 senyawa khalkon dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18



Gambar 5.23 Profil kemurnian puncak dengan waktu retensi 12,360 menit dari kromatogram senyawa khalkon yang dielusi dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18

Dari kromatogram diatas, senyawa khalkon memiliki waktu retensi sekitar 12 sampai 13 menit. Pergeseran waktu retensi kemungkinan disebabkan karena kondisi alat yang sedikit berbeda pada saat eluasi. Nilai *purity factor* dari puncak senyawa khalkon adalah 995,966 sehingga dapat dikatakan bahwa puncak senyawa yang dianalisis memenuhi syarat kemurnian dan terpisah

dengan cukup baik dari senyawa-senyawa lainnya dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak.



Gambar 5.24 Profil spektrum puncak senyawa yang dianalisis pada ekstrak dan senyawa khalkon dengan waktu retensi 12-13 menit setelah dielusi dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18

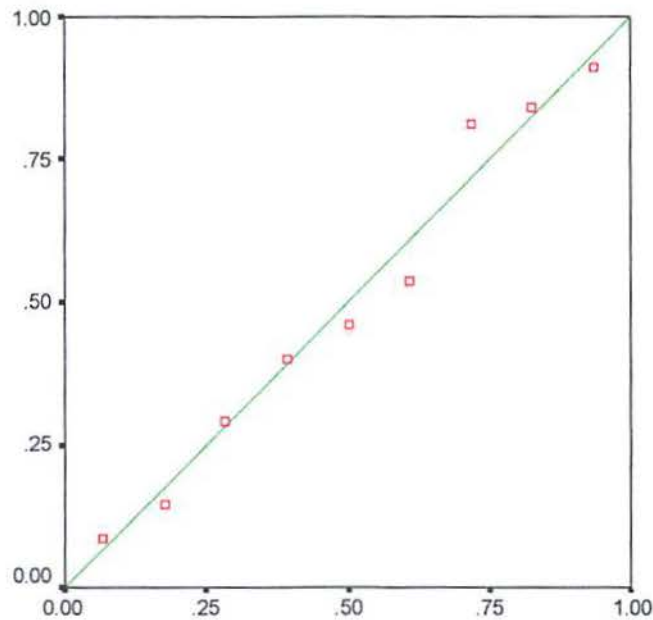
Dari spektrum senyawa standar (khalkon) dan senyawa yang dianalisis pada ekstrak, diperoleh nilai *match factor* 981,261 (>950,000), sehingga disimpulkan bahwa senyawa yang memiliki waktu retensi antara 12 sampai 13 menit adalah senyawa khalkon yang terdeteksi dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak.

2. Parameter Linearitas

Linearitas ditentukan dengan menginjektikan larutan standar dengan konsentrasi 20 sampai 70 ppm. Kemudian dibuat kurva regresi linier antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU).

Tabel 5.20 Tabel konsentrasi larutan standar yang diinjektikan pada KCKT (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No	Konsentrasi larutan standar (ppm)	Luas area (mAU)
1	70	742,161
2	60	622,148
3	50	528,556
4	45	473,820
5	40	411,047
6	35	365,303
7	30	298,254
8	25	235,143
9	20	183,489



Gambar 5.25 Kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU)

Berdasarkan hasil analisis regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU), diperoleh persamaan regresi:

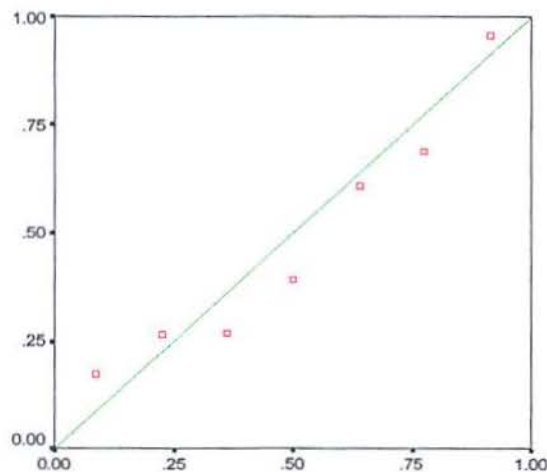
$$Y = 11,127x - 34,749, \text{ dengan nilai koefisien korelasi } (r) = 0,999.$$

3. Penentuan LOD dan LOQ

Limit of Detection (LOD) merupakan konsentrasi terkecil dari analit yang masih bisa dideteksi pada kondisi analisis yang digunakan. *Limit of Quantitation* (LOQ) merupakan konsentrasi terkecil dari analit yang dapat ditentukan dengan akurasi dan presisi pada kondisi analisis. Pada analisis dengan menggunakan KCKT, LOD dan LOQ ditunjukkan dengan rasio *signal* terhadap *noise*.

Tabel 5.21 Hasil penentuan LOD dan LOQ pada penetapan kadar senyawa khalkon dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak

No	Konsentrasi larutan standar (ppm)	Luas area (mAU)
1	7,00	65,1159
2	5,60	54,0366
3	3,50	34,3393
4	2,80	29,9323
5	1,40	12,1548
6	0,70	6,1134
7	0,56	4,1274

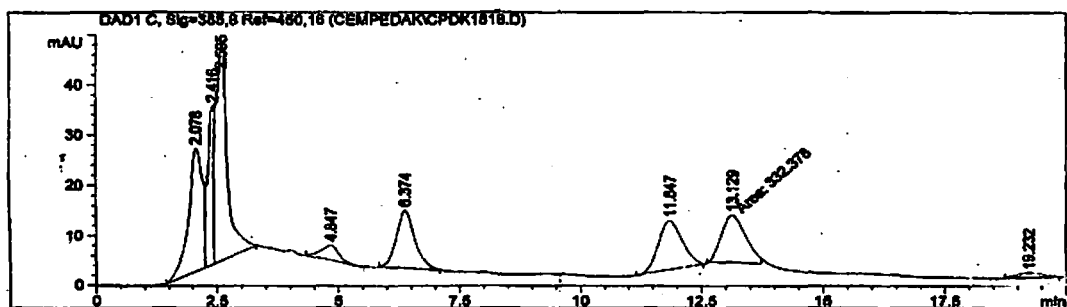


Gambar 5.26 Kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU)

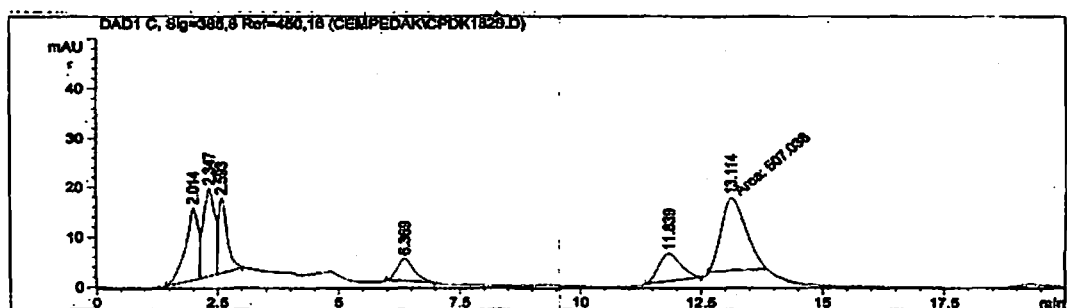
Berdasarkan data pada tabel 5.23, diperoleh persamaan regresi linier sebagai berikut: $Y = 9,5656x - 0,0591$, dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,997. Nilai LOD adalah 0,011 ppm dan nilai LOQ adalah 0,0335 ppm.

4. Penentuan Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dengan satu seri kadar, larutan ekstrak etanol serta larutan ekstrak etanol ditambah standar dengan replikasi sebanyak 6 kali. Luas area dari ekstrak etanol dimasukkan dalam persamaan regresi sehingga diperoleh kadar senyawa khalkon dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak.



Gambar 5.27 Profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang cempedak dengan konsentrasi 10.000 ppm yang dianalisis dengan KCKT Agilent 1100



Gambar 5.28 Profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang cempedak yang ditambahkan standar dan dianalisis dengan KCKT Agilent 1100

Pada kromatogram gambar 5.27 dan 5.28 di atas, tampak bahwa puncak kromatogram dengan Rt 13 menit mempunyai luas area 332.378 dan setelah ditambahkan dengan standar maka puncak dengan Rt 13 menit bertambah luas areanya menjadi 507.038 sehingga dapat disimpulkan bahwa standar senyawa khalkon terdeteksi pada ekstrak etanol dengan Rt 13 menit.

Tabel 5.22 Tabel konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak yang diinjeksikan pada KCKT (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No	Konsentrasi ekstrak etanol (ppm)	Luas area (mAU)	Kadar senyawa khalkon dalam ekstrak (ppm) $Y = 11,127x - 34,749$	Kadar senyawa khalkon dalam ekstrak (%)
1	10.000	340,701	33,742	0,337
2	10.000	332,378	32,994	0,330
3	10.000	348,954	34,484	0,345
4	10.000	335,601	33,284	0,333
5	10.000	289,556	29,146	0,291
6	10.100	397,112	38,812	0,384
Rata-rata				0,337
SD				0,0298
KV				8,843

Tabel 5.23 Hasil pengukuran akurasi pada penetapan kadar senyawa khalkon dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak

No	Konsentrasi (ppm)		Kadar standar (ppm)	Kadar yang diperoleh (ppm)	% Recovery
	Ekstrak	Standar			
1	5.000	35	35	54,413	104,899
2	5.000	35	35	53,681	103,487
3	5.000	35	35	51,297	98,891
4	5.000	35	35	48,539	93,575
5	5.000	35	35	48,691	93,868
6	5.000	35	35	50,251	96,875
% Rekoveri rata-rata					98,599
Koefisien variasi (KV)					4,780

Akurasi dihitung berdasarkan nilai rekoveri kadar khalkon dalam ekstrak terhadap kadar standar yang ditambahkan. Nilai rekoveri yang dapat diterima

yaitu antara 95-105%. Dari data pada tabel 5.22 dan 5.23, diperoleh % rekoveri sebesar 98,599%, sehingga metode analisis penentuan kadar menggunakan KCKT ini menghasilkan nilai rekoveri yang dapat diterima.

5. Penentuan Presisi Alat

Untuk penentuan presisi alat, larutan standar dengan konsentrasi 35 ppm diinjeksikan pada KCKT dengan replikasi 10 kali, kemudian ditentukan standar deviasi (SD) dan koefisien variasinya (KV).

Tabel 5.24 Tabel konsentrasi larutan standar yang diinjeksikan pada KCKT (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No	Konsentrasi larutan standar (ppm)	Luas area (mAU)
1	35	297,9427
2	35	315,1972
3	35	309,7522
4	35	290,6746
5	35	317,7334
6	35	323,5499
7	35	326,0963
8	35	336,0297
9	35	325,4766
10	35	261,3296
Rata-rata		310,3782
SD		20,8156
KV		6,7065 %

Berdasarkan data pada tabel 5.24, diperoleh nilai koefisien variasi sebesar 6,7065 % untuk penentuan presisi alat KCKT yang digunakan selama analisis.

6. Penentuan Presisi Metode

Tabel 5.25 Tabel konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak yang diinjekkan pada KCKT (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No	Konsentrasi ekstrak etanol (ppm)	Luas area (mAU)	Kadar senyawa khalkon dalam ekstrak (ppm) $Y = 11,127x - 34,749$	Kadar senyawa khalkon dalam ekstrak (%)
1	10.000	340,701	33,742	0,337
2	10.000	332,378	32,994	0,330
3	10.000	348,954	34,484	0,345
4	10.000	335,601	33,284	0,333
5	10.000	289,556	29,146	0,291
6	10.100	397,112	38,812	0,384
Rata-rata				0,337
SD				0,0298
KV				8,843

Penentuan presisi metode berdasarkan data pada tabel 5.25 diatas, diperoleh kadar rata-rata senyawa khalkon dalam ekstrak 0,337% b/b dengan koefisien variasi 8,843%.

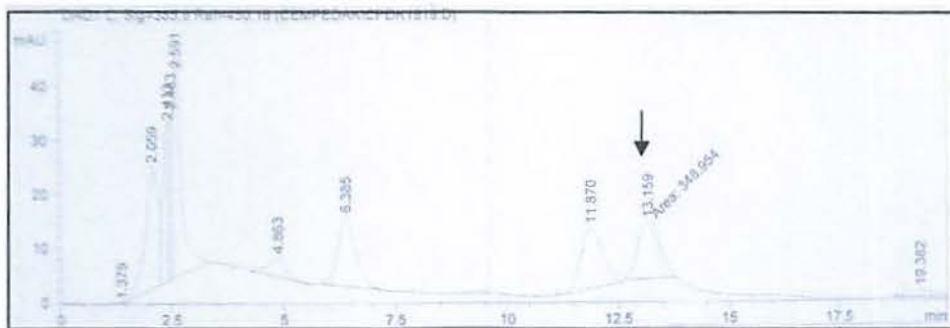
5.5.2. Penetapan kadar khalkon dalam Ekstrak Etanol kulit batang cempedak

Tabel 5.26 Tabel konsentrasi ekstrak etanol kulit batang cempedak yang diinjekkan pada KCKT (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No	Konsentrasi ekstrak etanol (ppm)	Luas area (mAU)	Kadar senyawa khalkon dalam ekstrak (ppm) $Y = 11,127x - 34,749$	Kadar senyawa khalkon dalam ekstrak (%)
1	10.000	340,701	33,742	0,337
2	10.000	332,378	32,994	0,330
3	10.000	348,954	34,484	0,345
4	10.000	335,601	33,284	0,333
5	10.000	289,556	29,146	0,291
6	10.100	397,112	38,812	0,384
Rata-rata				0,337
SD				0,0298
KV				8,843

Data pada tabel diatas menunjukkan bahwa kadar khalkon dalam ekstrak etanol kulit batang cempedak sebesar 0,337 %, pada analisis menggunakan KCKT Agilent 1100 dengan kondisi fase gerak metanol-air (65:35 v/v), kecepatan alir 1 ml/menit, suhu kolom 30°C, pada panjang gelombang maksimum 385 nm dan presisi alat dengan koefisien variasi 6,7065 %.

5.5.3. Profil kromatogram KCKT ekstrak etanol *A. champeden*



Gambar 5.26 Profil kromatogram hasil KCKT Agilent 1100 ekstrak etanol (Eet) dengan eluen metanol-air (65:35 v/v) kolom Microsorb RP-18

Berdasarkan profil kromatogram ekstrak etanol kulit batang cempedak, dapat dilihat bahwa khalkon terdeteksi pada ekstrak pada waktu retensi sekitar 12-13 menit (tanda panah).

5.6 Uji Toksisitas dan Keamanan pada Hewan Coba

5.6.1. Pengujian Toksisitas Akut

Perhitungan Dosis

Dosis perlakuan yang digunakan berdasarkan klasifikasi toksisitas dosis tertinggi dimana termasuk kategori relatif tidak berbahaya yaitu 21g/kg BB mencit. Dosis perlakuan yang digunakan pada mencit 20 g adalah 0,42 g ekstrak etanol.

Data Hasil Pengamatan

Tabel 5.27 Hasil uji toksisitas akut sediaan suspensi dari sediaan ekstrak cempedak pada mencit

Kelompok	Jumlah Mencit	
	Mati	Hidup
1	0	5
2	0	5
3	0	5
4	0	5

Pada uji toksisitas akut pada mencit digunakan dosis yang tertinggi yang tergolong relatif tidak berbahaya yaitu 21 g/kg BB mencit. Hasil uji toksisitas akut dengan dosis yang tertinggi tersebut tidak menunjukkan kematian pada mencit sehingga disimpulkan bahwa semua toksisitas akut yang berbahaya dapat disingkirkan dengan LD₅₀ tidak perlu ditentukan atau dapat pula dosis yang digunakan yaitu dosis yang tergolong klasifikasi relatif tidak berbahaya tersebut dijadikan sebagai LD₅₀ untuk sediaan suspensi ekstrak etanol dari kulit batang *Artocarpus champeden* Spreng.

5.6.2 Uji Toksisitas Subakut

Perhitungan Dosis

Dosis perlakuan dibagi menjadi tiga dosis yaitu Dosis Lazim (D1), 5 kali Dosis Lazim (D2) dan 10 kali Dosis Lazim (D3). Dosis lazim yang digunakan adalah berat ekstrak yang setara dengan 25,48 mg simplisia/mencit (20 g). Berdasarkan hasil ekstraksi maka 25,48 simplisia setara dengan 1,9017 mg ekstrak etanol, sehingga didapat data sebagai berikut :

D1 : 1,9017 mg

D2 : 9,5085 mg

D3 : 19,017 mg

Tabel 5.28 Hasil Pemeriksaan Kadar SGOT dan SGPT pada Mencit

Dosis	Replikasi	SGOT	SGPT
Kontrol Negatif	1	139	369
	2	130	110
	3	136	61
	4	140	37
	5	102	46
DL	1	151	98
	2	186	94
	3	158	44
	4	126	51
	5	102	40
5 DL	1	181	52
	2	212	86
	3	264	78
	4	179	61
	5	263	64
10 DL	1	245	124
	2	227	44
	3	221	49
	4	243	62
	5	285	157

Hasil Analisis Data

Dari data-data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode statistik ANAVA sehingga akan didapatkan harga – harga sebagai berikut:

Tabel 5.29 Harga Rerata Kadar SGOT Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar SGOT (IU/L)	Simpangan Baku
Kontrol	5	129,4	15,8
Kelompok DL	5	144,6	31,9
Kelompok 5 DL	5	219,8	41,9
Kelompok 10 DL	5	244,2	25,0

Tabel 5.30 Ringkasan ANAVA Kadar SGOT Hewan Coba

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	47191	3	15730,3	17,185	0,000
Dalam Kelompok	14646	16	915,375		
Total	61837	19			

Dari data diatas menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar SGOT. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih kecil daripada 0,05.

Tabel 5.31 Harga Rerata Kadar SGPT Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar SGPT (IU/L)	Simpangan Baku
Kontrol	5	124,6	139,5
Kelompok DL	5	65,4	28,2
Kelompok 5 DL	5	68,2	13,6
Kelompok 10 DL	5	87,2	50,4

Tabel 5.32 Ringkasan ANAVA Kadar SGPT Hewan Coba

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	11160,5	3	3720,1	0,647	0,596
Dalam Kelompok	91964	16	5747,7		
Total	103124,5	19			

Dari data diatas menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar SGPT. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih besar daripada 0,05.

Pada hasil uji ANAVA terhadap kadar SGOT menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok, hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0,05. Selanjutnya dilakukan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan perbedaan antara kontrol dengan kelompok 5 Kali Dosis Lazim (5DL) dan 10 Kali Dosis Lazim (10DL). Rata-rata kadar SGOT kelompok kontrol = 129,4 IU/l, kelompok DL = 144,6 IU/l, kelompok 5 DL = 219,8 IU/l, kelompok 10 DL = 244,2 IU/l. Sedangkan harga normal SGOT pada mencit adalah 70-400 U/L. Berarti tidak ada pengaruh peningkatan SGOT terhadap hewan coba terhadap pemberian Eet dengan dosis lazim, 5 kali dosis lazim, dan 10 kali dosis lazim. Rata-rata kadar SGPT kelompok kontrol = 124,6 IU/l, kelompok DL = 65,4 IU/L, kelompok 5 DL = 68,2 IU/l, kelompok 10 DL = 87,2 IU/l. Sedangkan harga normal SGPT pada mencit adalah 25-200 U/L. Pada uji ANAVA terhadap kadar SGPT tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) pada tabel yang lebih besar dari 0,05. Jadi

pemberian bahan uji dengan dosis 1 kali dosis lazim, 5 kali dosis lazim, 10 kali dosis lazim selama 30 hari tidak mempengaruhi kadar SGPT hewan coba.

Nilai Skor Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit

Perubahan yang nampak pada gambaran histopatologi hati mencit diperoleh dari pengamatan secara mikroskopik melalui lima lapang pandang yang berbeda terhadap seluruh kelompok perlakuan, dicatat, diskor lalu diolah dengan penilaian peringkat (Rank).

Tabel 5.33 Nilai skor perubahan gambaran histologi mencit pada seluruh kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa degenerasi pada uji ekstrak etanol

NO	KC	D1	D2	D3
1	0	0	1	2
2	0	1	1	1
3	0	1	2	2
4	0	1	1	2
5	0	1	2	2

Tabel 5.34 Nilai skor perubahan gambaran histologi mencit pada seluruh kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa nekrosis pada uji ekstrak etanol

NO	KC	D1	D2	D3
1	0	0	1	2
2	0	0	1	1
3	0	1	1	2
4	0	1	1	3
5	0	1	1	2

Keterangan :

N = Ulangan

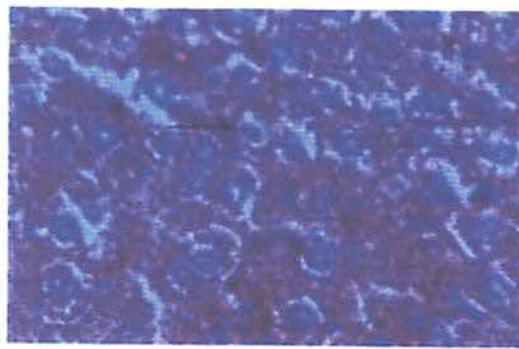
KC = Kelompok Kontrol diberi suspensi CMC-Na

D1 = Kelompok Dosis 1 (DL)

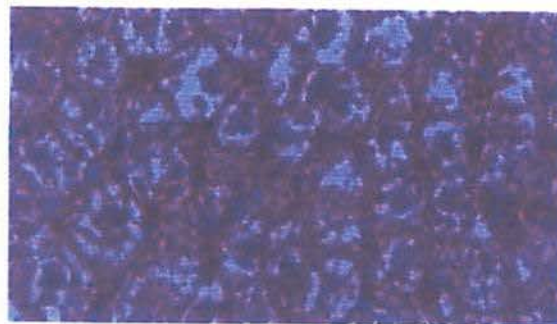
D2 = Kelompok Dosis 2 (5x DL)

D3 = Kelompok Dosis 3 (10xDL)

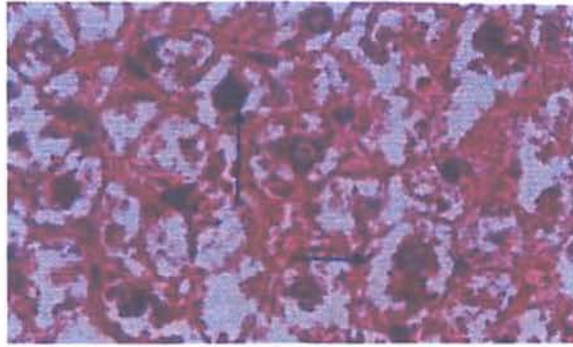
Pemeriksaan kerusakan organ hati dilakukan dengan cara melihat gambaran histologi hati mencit yang telah diberi bahan uji dengan menggunakan mikroskop elektron.



Gambar 5.27 Gambaran mikroskopis Sel Hati Mencit pada Kelompok Dosis I dengan Pewarnaan HE dan Perbesaran 400x yang tampak mengalami perubahan histopatologi berupa degenerasi (→) sel akibat pemberian Ekstrak Etanol Kulitang Cempedak Dosis Lazim (skor 2)



Gambar 5.28 Gambaran Mikroskopis Sel Hati Mencit pada kelompok Dosis 2 dengan Pewarnaan HE dan perbesaran 400x yang tampak mengalami perubahan histopatologi berupa degenerasi (→) sel akibat pemberian Ekstrak Etanol Kulit Batang Cempedak 5x Dosis Lazim (skor 2)



Gambar 5.29 Gambaran Mikroskopis Sel Hati Mencit pada kelompok dosis 3 dengan Pewarnaan HE dan Perbesaran 400x yang tampak mengalami Perubahan Histopatologi berupa degenerasi (→) sel (skor 3) dan nekrosis (↑) sel (skor2) akibat pemberian Ekstrak Etanol Kulit Batang Cempedak 10x Dosis Lazim

Berdasarkan hasil pengamatan pada preparat hati mencit melalui lima lapang pandang menunjukkan adanya perubahan histopatologi hati berupa degenerasi dan nekrosis. Perubahan-perubahan tersebut kemudian dicatat dan dilakukan skoring. Data yang didapat selanjutnya dianalisis dengan uji statistik Kruskal Wallis, diperoleh hasil adanya perubahan nyata antara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan Uji Perbandingan Berganda (Uji Z) 5%.

Dari hasil uji statistik dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan mengenai degenerasi dan nekrosis yang terjadi antara kelompok uji dan kelompok kontrol, pada mencit dengan pemberian ekstrak etanol 1,9017 mg/20 g BB mencit selama 30 hari, sehingga total pemberian ekstrak etanol adalah sebesar 57,051 mg. Sedangkan pada uji *in vivo* digunakan dosis 100 mg/kg BB mencit sehingga untuk mencit dengan berat badan 20 g digunakan 2 mg ekstrak. Pemberian ekstrak etanol pada uji aktivitas *in vivo* dilakukan sekali sehari selama 4 hari sehingga total ekstrak yang digunakan adalah sebesar 8 mg. Dapat dilihat bahwa dosis yang digunakan dalam uji aktivitas relatif jauh lebih kecil dari dosis yang menyebabkan degenerasi dan nekrosis.

BAB VI**KESIMPULAN DAN SARAN****6.1. Kesimpulan**

1. Senyawa marker dari ekstrak etanol kulit batang cempedak merupakan golongan khalkon
2. Nilai parameter standar non spesifik simplisia kulit batang cempedak yaitu kadar abu sebesar $8,644 \% \pm 0,16$ dan susut pengeringan $9,07 \% \pm 0,19$. Nilai parameter standar non spesifik ekstrak etanol kulit batang cempedak yaitu kadar abu total sebesar $3,2 \% \pm 0,2 \%$, kadar abu tidak larut asam $0,45 \% \pm 0,03\%$, kadar air $15,65 \% \pm 0,58\%$, susut pengeringan $12,6 \% \pm 0,86\%$, cemaran logam berat memenuhi ketentuan WHO yaitu Pb $0,138 \text{ mg/kg}$, Cd $0,139 \text{ mg/kg}$, dan Cu $0,595 \text{ mg/kg}$.
3. Pengembangan metode analisis penentuan kadar marker dalam ekstrak etanol dengan menggunakan KCKT Agilent 1100, kolom Microsorb RP18, suhu kolom 30°C , kecepatan alir 1 ml/menit , fase gerak metanol-air ($65:35 \text{ v/v}$) menghasilkan nilai resolusi sebesar 1,4, *purity factor* 995,966, *match factor* 981,261, koefisien korelasi, r , 0,999, batas deteksi 0,01 ppm, batas kuantitasi 0,03 ppm, nilai rekoverti 98,599%, KV pada presisi alat 6,7065 % dan pada presisi metode 8,84%. Pada kondisi optimal tersebut, diperoleh kadar marker dalam ekstrak sebesar 0,337 % b/b.
4. Ekstrak etanol 80% dari kulit batang cempedak dapat menghambat pertumbuhan parasit *P. berghei in vivo* pada mencit sebesar 76,70% pada dosis 100 mg/kg BB mencit dengan nilai ED_{50} sebesar $0,2447 \text{ mg/kg}$ BB

mencit untuk perlakuan selama 4 hari, dan dapat menghambat pertumbuhan *P.falciparum in vitro* dengan nilai $IC_{50} = 1,8983 \mu\text{g/mL}$.

5. Pada uji toksisitas akut dan subakut, menunjukkan bahwa pemberian oral ekstrak etanol 80% kulit batang cempedak pada hewan coba mencit relatif tidak toksik dan tidak ada pengaruh peningkatan SGOT dan SGPT serum hewan coba setelah pemberian oral ekstrak etanol cempedak. Berdasarkan gambaran histopatologi hati, pemberian ekstrak etanol 80% kulit batang cempedak dengan dosis lazim 1,9017 mg/20 g BB mencit selama 30 hari dapat menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histologi berupa degenerasi dan nekrosis.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk:

1. Purifikasi dan elusidasi struktur marker yang telah diidentifikasi sebagai golongan khalkon.
2. Mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak etanol terstandar kulit batang cempedak dalam hubungannya sebagai antimalaria.
3. Mengetahui aktivitas antimalaria ekstrak etanol terstandar kulit batang cempedak secara *in vivo* pada mencit dengan pemberian melalui intraperitoneal.
4. Formulasi ekstrak etanol terstandar kulit batang cempedak untuk dikembangkan sebagai sediaan fitofarmaka.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad SA, 2004. Empat Puluh Tahun Dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuh-Tumbuhan Tropika Indonesia : Rekoleksi Dan Prospek. **Bull Soc Nat Prod Chem** 4 : 35-54
- Backer CA, Backhuizen Van Den Brink BC, 1965. **Flora of Java** Vol. II Groningen The Netherland: NVP Noordhoff, pp 19.
- Biagini GA, O'Neill, Nzila PM, Ward SA, 2003. Antimalarial Chemotherapy : young guns or back to the future, **Trends in Parasitol.** 19 (11) : 479-487
- Bjorge S, 2004. Strategic Plant to Roll Back Malaria in SE Asia Region. WHO, **Proceeding Symposium of Malaria Control in Indonesia**, November 29-30, 2004. Kerjasama TDC Universitas Airlangga dan JICA, pp 14-30.
- Boonlaksiri C, Oonanant W, Kongsaree P, Kittakoop P, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y, 2000. An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*. **J Phytochem** 54: 415-417.
- Burke E, Deasy J, Hasson R, McCormack R, Randhawa V, Walsh P, 2003. Antimalarial Drug From Nature, **J Trinity Student Med.** <http://www.google.com/search?q=Burke+antimalarial+drug+in+nature&btnG=Search&hl=en>.
- Chen M, Theander TG, Christensen SB, Hviid L, Zhai L, Kharazmi A, 1994. Licochalcone A, a new antimalarial agent inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *Plasmodium yoelii* infection. **Antimicro and Chemother** 38 (7) : 1470-1475.
- Daily JP, Roberts C, Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wirth DF, 2003. Prevalence of *Plasmodium falciparum pfcrt* Polimorphisms and in vitro cloroquine Sensitivity in Senegal. **J Parasitol** 126 : 401- 405.
- Daniel WW, 1989. **Statistika Nonparametrik Terapan** (terjemah oleh Elex Tri Kantjono W), Penerbit PT.Gramedia, Jakarta
- Depkes RI, 1987. **Analisis Obat Tradisional**. Jilid I, hlm 43-52.
- Depkes RI, 1989, **Materia Medika Indonesia**, jilid V, Jakarta
- DepKes, 2004. Penggunaan Artemisinin untuk Atasi Malaria di daerah yang resisten Klorokuin. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, <http://www.lipi.go.id>.

- Dorelanko MJ, Holinger MA, 1995. **CRC Handbook of Toxicology**, CRC Press, New York
- Ghosh MN, 1971. **Fundamental of Exsperimental Pharmacology**, Scientific Book Agency, Calcutta.
- Go ML, Liu M, Wilairat P, Rosenthal PJ, Saliba JS, Kirk K, 2004. Antiplasmodial Chalchones Inhibit Sorbitol-Induced Hemolysis of *Plasmodium falciparum* Infected Erythrocytes. **Antimicro Agent Chemother** 48 (9): 3241- 3245.
- Gritter RJ, 1991 (Terjemahan Padmawinata). **Pengantar Kromatografi**. Edisi III. Bandung, ITB.
- Hakim EH, Achmad SA, Juliawaty LD, Makmur L, Syah YM, Aimi N, Kitajima M., Takayama H., Ghisalberi EH, 2006. Prenylated flavonoids and related compounds of the Indonesian *Artocarpus* (Moraceae). **J Nat Med** 60: 161-184.
- Hakim EH, 1998. Artokarpin dan heteroflavanon-A, dua senyawa flavonoid bioaktif dari *Artocarpus champeden*, **Laporan Penelitian**, Lembaga Penelitian ITB, Bandung.
- Harborne JB, 1987. **Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan** (Terjemahan Kosasih P dan Iwang S), Ed 2, Bandung : Institut Teknologi Bandung, hlm 234-259.
- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia II**. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta, hal. 669-670.
- Hidayati, A.,R., Aty Widyawaruyanti, Wiwied Ekasari, (2003), Uji aktivitas antimalaria fraksi kloroform kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*) terhadap *Plasmodium berghei in-vivo*, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya
- Krettli AU, Andrade-Neto VF, Brando MGL, Wanessa MSF, 2001. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants used to Treat Fever and malaria or plant Randomly selected. **Mem. Inst. J Cruz Rio de janeiro** 96 (80) : 1033-1042.
- Kutner SW, Breuer V, Ginsburg H, Cabantchik, 1987. On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. **Biochem Pharmacol** 36 (1) : 123-129.
- Markham, K.R., 1985 (Terjemahan Padmawinata), **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**, Penerbit ITB, Bandung.

- Noedl, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH, 2003. Malaria Drug Sensivity Testing: New Assay, New Perspectives. *J Trends Parasitol* 19(4): 175-181.
- Olliaro PL, Taylor WR, 2004. Developing Artemisinin Based Drug Combinations for the Treatment of Drug Resistant falciparum Malaria : A Review. *J Postgraduate Med* 50 (1) : 40-44.
- Phillipson JD, Wright CW, 1991. Antiprotozoal Agents Plant Sources. *Planta Medica* 57 (1): 53-59.
- Rosenthal PJ, 2001. Antimalarial Chemotherapy, Mechanism of Action Resistance and New Direction in Drug Discovery. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz On Line 96 (8) : 1185-1186.
- Sardjono SH, 1992. **Prespektif Pengembangan Obat Tradisional di Indonesia**, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
- Saxena S, Pant N, Jain DC, Bhakuni RS, 2003. Antimalarial agents from plant sources. *Curr Sci* 84(9) : 1314—1329.
- Sub Direktorat Malaria, 2004. Kejadian Luar Biasa (KLB) malaria di Indonesia 1991-2003. Direktorat Jenderal Pencegahan Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan Pemukiman. Jakarta.
- Tjitra E, 2004. Pengobatan malaria dengan kombinasi Artemisinin, **Proceeding Symposium of malaria control in Indonesia**, November 29-30, 2004. Kerjasama TDC universitas Airlangga dan JICA. P 63-72.
- Tjitra, E., 2003. Studi perbandingan pengobatan halofantrin antara penderita malaria *falciparum* tanpa komplikasi yang *in vivo* sensitif dengan yang resisten klorokuin, *Bul Penel Kes* 21 (1) : 123
- Utomo, D. N. W., Widyawaruyanti, A., Ekasari, W., (2003), Aktivitas antimalaria ekstrak methanol kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* SPRENG) terhadap *Plasmodium berghei in-vivo*, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.
- Van Steenis CGGJ, 1978. **Flora untuk Sekolah di Indonesia**, Jakarta : Pradnya Paramita, hlm 406-407.
- Vickery ML, Vickery B, 1981. **Secondary Plant Metabolism**, 1st Ed. Baltimore: University Park Press, pp183-186.
- Widyawaruyanti, A., 2007, Ekstrak Terstandar Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) Sebagai Bahan Baku Obat Fitoframaka Antimalaria Potensial, Laporan Penelitian Tahun I, Proyek DP3M anggaran 2008, DIKTI.

- Widyawaruyanti, A., Subehan, Kalauni, S.,K., Asih B.,S., Nindatu, M., Awale S., Kadota, S., Sjafruddin, Zaini N., C., 2006, Antimalarial activity of new prenylated flavones from *Artocarpus champeden* Spreng against *Plasmodium falciparum*, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, *in process*
- Wisser MF, 2001. Biochemistry of Plasmodium. Reviuw, Tulane University, http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref_msp. 15 Maret 2006.
- Wisser MF, 2004. Cellular and Molecular biology of *Plasmodium*. Reviuw, Tulane University, http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref_msp. 15 Maret 2006
- World Health Organization, 1985. Special programe for research and training training in tropical disease research TDR seventh program report malaria (2), **WHO Spec. Programe for Trop. Disease**.
- World Health Organization. 19 Mei 2003. **WHO Report Meeting on Antimalarial Drug Development**. Manila. <http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai>.
- Zaini N.,C., Sjafruddin, Dachlan, Y.,P., 2005, Potensi dan mekanisme aksi senyawa aktif antimalaria dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng), **Laporan Penelitian Tahun I**, Hibah Tim Pasca Sarjana tahun anggaran 2005/2006, DIKTI.
- Zaini N.,C., Sjafruddin, Dachlan, Y.,P., 2006, Potensi dan mekanisme aksi senyawa aktif antimalaria dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng), **Penelitian tahun II**, Hibah Tim Pasca Sarjana tahun anggaran 2005/2006, DIKTI. (*on going process*)
- Ziegler HL, Staerk D, Christensen J, Hviid L, Hagerstrand H, Jaroszewski JW, 2002. In Vitro *Plasmodium falciparum* drug sensitivity assay : Inhibition of Parasite Growth by Incorporation of Stomatocytogenic Amphiphiles into Erythrocyte membran. **Antimicro Agents and Chemother** 46 (5) : 1441- 1446.

Lampiran 1

Ringkasan persen penghambatan fraksi F1-F6 ekstrak etanol kulit batang cempedak terhadap *Plasmodium falciparum* dan hasil analisis probit

Fraksi	% Hambatan pada dosis uji ($\mu\text{g/mL}$)					IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	10	1	0,1	0,01	0,001	
F1	55,55	10,25	9,33	8,70	8,07	43,54879
F2	34,98	12,57	12,00	11,79	9,92	8019,87781
F3	66,35	26,08	19,67	16,50	16,56	6,69797
F4	56,41	15,96	13,55	10,62	7,79	24,51743
F5	70,95	13,62	8,01	6,48	6,74	7,25322
F6	17,72	8,59	9,76	7,78	2,62	977567,06679

Lampiran 2

Hasil Analisis ANAVA Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Cempedak

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
SGOT KONTROL	5	129.40	15.805	7.088	109.78	149.02	102	140
DL	5	144.60	31.997	14.309	104.87	184.33	102	186
5DL	5	219.80	41.985	18.776	167.67	271.93	179	264
10 DL	5	244.20	25.004	11.182	213.15	275.25	221	285
Total	20	184.50	57.049	12.757	157.80	211.20	102	285
SGPT KONTROL	5	124.60	139.500	62.386	-48.61	297.81	37	369
DL	5	65.40	28.245	12.632	30.33	100.47	40	98
5DL	5	68.20	13.646	6.102	51.26	85.14	52	86
10 DL	5	87.20	50.465	22.569	24.54	149.86	44	157
Total	20	86.35	73.672	16.474	51.87	120.83	37	369

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
SGOT	2.435	3	16	.103
SGPT	3.693	3	16	.034

ANOVA

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
SGOT	Between Groups	47191.000	3	15730.333	17.185	.000
	Within Groups	14646.000	16	915.375		
	Total	61837.000	19			
SGPT	Between Groups	11160.550	3	3720.183	.647	.596
	Within Groups	91964.000	16	5747.750		
	Total	103124.550	19			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

SGOT

Duncan

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
KONTROL	5	129.40	
DL	5	144.80	
5DL	5		219.80
10 DL	5		244.20
Sig.		.439	.220

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

SGPT

Duncan

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05
		1
DL	5	65.40
5DL	5	68.20
10 DL	5	87.20
KONTROL	5	124.60
Sig.		.272

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 3**Data uji toksisitas subakut dengan parameter histopatologi hati****Tabel. Tingkat dan Jumlah Skor Perubahan Histopatologi Hati Mencit yang Mengalami Degenerasi****KONTROL CMC-Na 0,5% (KC)**

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	1	1	0	0	0
2	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1	1	0	0
5	0	0	0	0	0	0

DOSIS 1 (D1)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	1	1	1	0	1	0
2	1	1	1	1	1	1
3	2	1	2	1	1	1
4	1	2	2	1	0	1
5	1	1	1	2	0	1

DOSIS 2 (D2)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	2	1	1	2	1	1
2	1	1	1	1	1	1
3	2	2	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1	1
5	2	2	2	2	2	2

DOSIS 3 (D3)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	2	2	3	3	2	2
2	3	1	1	2	2	1
3	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2
5	2	2	2	2	3	2

Tabel. Tingkat dan Jumlah Skor Perubahan Histopatologi Hati Mencit yang Mengalami Nekrosis

KONTROL CMC-Na 0,5% (KC)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0

DOSIS 1 (D1)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	1	0	1	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0
3	2	1	1	0	1	1
4	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1

DOSIS 2 (D2)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	0	2	1
4	1	1	1	1	1	1
5	2	1	2	1	1	1

DOSIS 3 (D3)

n Ke	Lapang Pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	2	3	3	3	2	2
2	2	2	2	2	1	1
3	3	2	3	3	2	2
4	3	2	3	2	2	2
5	3	2	2	3	2	2

Lampiran 4**Hasil analisis data histopatologi hati dengan Kruskal-wallis test****NPar Tests****Kruskal-Wallis Test**

Ranks

	dosis	N	Mean Rank
degenerasi	kontrol	5	3.50
	dosis 1	5	9.10
	dosis 2	5	13.30
	dosis 3	5	16.10
	Total	20	

Test Statistics(a,b)

	degenerasi
Chi-Square	14.567
df	3
Asymp. Sig.	.002

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: dosis

Lampiran 5

Hasil analisis data histopatologi hati dengan Kruskal-wallis test

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks

	DOSIS	N	Mean Rank
NEKROSIS	kontrol	5	4.00
	Dosis 1	5	8.80
	Dosis 2	5	12.00
	Dosis 3	5	17.20
	Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	NEKROSIS
Chi-Square	15.246
df	3
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: DOSIS