

LAPORAN AKHIR HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2010



EFEK CASSIARIN A HASIL ISOLASI DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA
AKTIVITAS ANTIMALARIA DAN PERUBAHAN MORFOLOGI DARI
PLASMODIUM FALCIPARUM

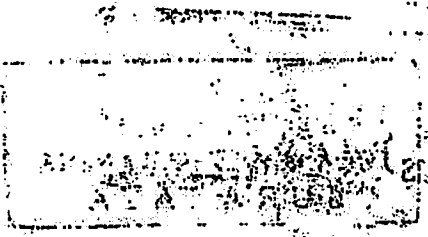
Dra. Wiwied Ekasari, Apt, MSi
Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi
Dr. Indah Tantular, MKes, PhD
dr. Syafruddin, Ph.D

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oktober 2010

SECRET
1954



CASSIA COERULEA

KESEHATAN

**LAPORAN AKHIR HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2010**



kk-2
kkB
LP-94/11
Efe

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**EFEK CASSIARIN A HASIL ISOLASI DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA
AKTIVITAS ANTIMALARIA DAN PERUBAHAN MORFOLOGI DARI
*PLASMODIUM FALCIPARUM***

Dra. Wiwied Ekasari, Apt, MSi
Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi
Dr. Indah Tantular, MKes, PhD
dr. Syafruddin, Ph.D

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oktober 2010

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Usulan : Efek Cassiarin A Hasil Isolasi Daun *Cassia siamea* pada Aktivitas Antimalaria dan Perubahan Morfologi dari *Plasmodium falciparum*

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dra. Wiwied Ekasari, Apt., MSi
- b. Jenis Kelamin : P
- c. NIP : 132 087 863
- d. Pangkat/Golongan : Lektor/III d
- e. Bidang Keahlian : Farmakognosi
- f. Fakultas/Jurusan : Farmasi Universitas Airlangga
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu
1.	Dr. Aty Widyawaruyanti Apt., Msi	Farmakognosi	Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Farmasi Unair	10 jam /minggu
2.	Dr. Indah S Tantular, Mkes	Parasitologi	Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Unair	10 jam /minggu
3.	Dr. Syafruddin, Ph.D	Biologi Molekuler	Lab. Malaria Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta	10 jam /minggu

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

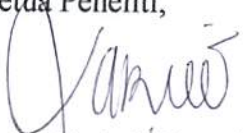
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp 100.000.000
- c. Biaya yang disetujui : Rp. 73.000.000



Mengetahui
Dekan Fakultas Farmasi,

Dr. Hj. Umi Athijah, MS., Apt.
NIP. 195604071981032001

Surabaya, Oktober 2010
Ketua Peneliti,


Dra. Wiwied Ekasari, MSi., Apt.
NIP. 196901221994032001



Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat,


Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi., Apt.
NIP 195908051987011001

RINGKASAN

EFEK CASSIARIN A HASIL ISOLASI DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA AKTIVITAS ANTIMALARIA DAN PERUBAHAN MORFOLOGI DARI *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Malaria sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius. Dilaporkan pada tahun 2006 terdapat 247 juta kasus malaria dari 3,3 miliar penduduk dunia yang berisiko terkena malaria serta mengakibatkan hampir 1 juta kematian. Data terbaru lainnya menyebutkan sebanyak 109 negara dinyatakan sebagai wilayah endemik untuk penyakit malaria dalam tahun 2008. Penanggulangan terhadap penyakit malaria saat ini menghadapi beberapa kendala, terutama oleh munculnya galur parasit yang resisten terhadap obat antimalaria yang ada dan belum ditemukannya vaksin antimalaria yang ideal. Oleh karena itu upaya untuk menemukan obat antimalaria baru merupakan prioritas utama program penanggulangan malaria.

Cassia siamea Lamk atau yang dikenal dengan nama daerah Johar dari familia Caesalpiniaceae telah lama digunakan secara tradisional untuk mengobati malaria. Penelitian terdahulu dari tanaman ini menunjukkan bahwa cassiarin A hasil isolasi daun *C. siamea* sangat aktif sebagai antimalaria dibandingkan hasil isolat lainnya. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian kali ini akan dilakukan uji aktivitas antimalaria dari cassiarin A secara lebih spesifik dan juga efek dari cassiarin A ini pada perubahan morfologi parasit.

Analisis morfologi parasit setelah diinkubasi dengan senyawa cassiarin A menunjukkan adanya perubahan morfologi parasit dalam bentuk cincin dari sitoplasma yang tidak sempurna, trophozoit yang terletak di luar eritrosit dan hemozoin yang berwarna hitam. Di samping itu, siklus pertumbuhan parasit ditemukan lebih lambat dibanding kelompok parasit yang tidak diberi cassiarin A. Analisis ultrastruktur parasit menunjukkan adanya sedikit kristal hemozoin namun dengan struktur yang tidak beraturan atau tidak ada sama sekali, adanya pembengkakan dari vakuola makanan, adanya peningkatan jumlah transport vesikel yang membawa hemoglobin serta juga adanya bentukan lamellar. Perubahan morfologi ini nampak makin jelas dengan meningkatnya dosis pemberian bahan uji.

Uji mekanisme aksi dari senyawa cassiarin A pada proses endositosis, menunjukkan bahwa cassiarin A menghambat proses endositosis dengan aktifitas yang lebih besar dibandingkan dengan klorokuin difosfat.

Hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa cassiarin A hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk menghambat pertumbuhan *P. falciparum* terutama pada fase tropik (24 jam) dan hambatan terbesar dari Cassiarin A didapatkan pada stadium skizon. Pengamatan dengan mikroskop cahaya menunjukkan adanya kelainan morfologi berupa degradasi parasit pada masa inkubasi 12-48 jam. Pengamatan secara ultra struktural membuktikan bahwa cassiarin A bekerja pada penghambatan proses endositosis dengan meningkatnya jumlah transport vesikel, degradasi hemoglobin dengan adanya pembengkakan vakuola makanan dan detoksifikasi heme dengan sedikit/tidak adanya kristal hemozoin. Penghambatan proses endositosis dari cassiarin A lebih besar daripada klorokuin difosfat sebagai obat antimalaria standard dari golongan alkaloid sehingga sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria baru

ABSTRACT

Isolation of the constituents of *C. siamea* Lamk leaves yielded cassiarin A and two unidentified isolates.

In vitro assay of cassiarin A against *P. falciparum* led to morphological alterations of ring form and trophozoites stages, as well as hemozoin. The growth of parasites was found slower than that untreated parasites. Ultrastructural analysis of parasites found only a small amount of hemozoin with irregular shape, some parasites showed no hemozoin at all, swelling of food vacuoles, increase in vesicle transport of hemoglobin, and lamellar formations.

Identification of biochemical targets of cassiarin A by means of inhibition test of endocytosis processes, showed a higher activity than that of chloroquine diphosphate.

The results indicated that an active antimalarial constituent of *C. siamea* Lamk leaves was an active antimalarial *in vitro* against *P. falciparum*, as well as inhibiting endocytosis, Hence, cassiarin A has a high potential as candidate for novel antimalarials agent.

Key word: *Cassia siamea* Lamk, antimalarial activity, endocytosis, ultrasructural analysis

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNYA sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul :

EFEK CASSIARIN A HASIL ISOLASI DAUN *CASSIA SLAMEA* PADA AKTIVITAS ANTIMALARIA DAN PERUBAHAN MORFOLOGI DARI *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Pada kesempatan ini TIM PENELITI menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA yang mendukung penelitian ini .

Tak lupa kami mengucapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

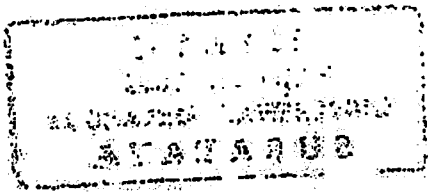
1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Unair yang mendukung dan membantu penelitian ini
2. Kepala Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas dana untuk penelitian ini.
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu menyediakan fasilitas dan sarana penelitian.
4. Seluruh staf Pengajar dan karyawan Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair
5. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Semoga amal ibadah Bapak-Bapak, Ibu-ibu serta rekan-rekan semuanya diterima oleh Allah SWT.

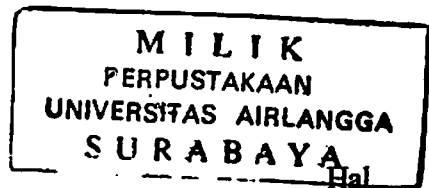
Kami menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih jauh dari sempurna, oleh sebab itu TIM PENELITI mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini dapat menjadi lebih baik .

Surabaya, Oktober 2010

Tim Peneliti



DAFTAR ISI



LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	iii
ABSTRAK	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan tentang Tanaman <i>C. siamea</i> Lamk	4
2.1.1 Klasifikasi tanaman	4
2.1.2 Kandungan <i>C. siamea</i> Lamk	5
2.1.3 Bioaktivitas <i>C. siamea</i> Lamk sebagai antimalaria	7
2.2 Senyawa Alkaloid dan Aktivitasnya sebagai Antimalaria	8
2.3 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam	9
2.3.1 Kromatografi	10
2.3.1.1 Kromatografi lapisan tipis	11
2.3.1.2 Kromatografi kolom	12
2.4 Tinjauan tentang Spektroskopi.....	12
2.4.1 Spektroskopi infra merah	13
2.4.2 Spektroskopi resonansi magnetik inti (RMI)	14
2.5 Tinjauan Uji Aktivitas Antimalaria secara <i>In Vitro</i>	15
2.6 Tinjauan tentang Endositosis	16
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
3.1 TUJUAN PENELITIAN	19
3.1.1. Tujuan Umum	19
3.1.2. Tujuan Khusus	19
3.2. MANFAAT PENELITIAN	20
3.2.1 Manfaat teoritis	20
3.2.2 Manfaat praktis	20
BAB IV. METODE PENELITIAN	21
4. 1 Bahan Penelitian	22
4.1.1 Bahan tanaman	22
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	22
4.2.1 Lokasi penelitian	22
4.2.2 Waktu penelitian	22
4.3 Prosedur Pengambilan/Pengumpulan Data	22
4.3.1 Persiapan sampel penelitian	22
4.3.1.1 Ekstraksi daun <i>C. siamea</i> Lamk	22
4.3.1.2 Fraksinasi daun <i>C. siamea</i> dengan kromatografi cair vakum	23
4.3.1.3 Pemisahan komponen alkaloid	23

4.3.1.3.1 Kromatografi kolom lambat	23
4.3.1.3.2 Pemisahan komponen alkaloid dengan kromatografi preparatif	23
4.3.2 Identifikasi isolat	24
4.3.2.1 Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis	24
4.3.2.2 Identifikasi dengan spektrometri infra merah	24
4.3.2.3 Identifikasi dengan spektrometri RMI	24
4.3.3 Uji aktivitas antimalaria <i>in vitro</i>	24
4.3.3.1 Sampel penelitian	24
4.3.3.2 Klasifikasi variabel penelitian	24
4.3.3.3 Definisi operasional	25
4.3.3.4 Persiapan medium tak lengkap (<i>incomplete medium</i>)	25
4.3.3.5 Persiapan serum	25
4.3.3.6 Persiapan medium lengkap	25
4.3.3.7 Persiapan eritrosit 50%	26
4.3.3.8 Prosedur biakan	27
4.3.3.9 Penyiapan bahan uji	27
4.3.3.10 Prosedur pengujian	27
4.3.3.11 Evaluasi hasil uji efek antimalaria	27
4.3.3.12 Analisa data	28
4.3.4 Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap kondisi morfologi parasit	28
4.3.4.1 Sampel penelitian	28
4.3.4.2 Klasifikasi variabel penelitian	28
4.3.4.3 Definisi operasional	29
4.3.4.5 Prosedur pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi	29
4.3.4.6 Analisis data	32
4.3.5 Uji hambatan proses endositosis	32
4.3.5.1 Sampel penelitian	32
4.3.5.2 Klasifikasi variabel penelitian	32
4.3.5.3 Definisi operasional	32
4.3.5.4 Prosedur pengujian	32
4.3.5.5 Analisis data	33
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	34
5.1 Isolasi Senyawa Cassiarin A dari Daun <i>C. siamea</i> Lamk	34
5.1.1 Hasil isolasi	34
5.1.2 Identifikasi isolat 1, isolat 2 dan isolat 3	38
5.1.2.1 Hasil identifikasi isolat 1 dan isolat 3	38
5.1.2.2 Hasil identifikasi isolat 2	39
5.1.2.2.1 Hasil identifikasi dengan metode spektrofotometri RMI	39
5.1.2.2.2 Hasil identifikasi dengan metode spektrometri massa	39
5.2 Aktivitas Antimalaria Senyawa Cassiarin A Daun <i>C. siamea</i> Terhadap <i>P. falciparum</i> Pada Masa Inkubasi 12, 24 dan 48 jam	41
5.3 Hambatan Tiap Stadium Parasit Pada Pemberian Cassiarin A Pada Masa Inkubasi 12, 24 dan 48 jam	44
5.4 Efek Senyawa Cassiarin A terhadap Morfologi Parasit Malaria Menggunakan Mikroskop Cahaya	46
5.5 Analisis Ultrastruktur Parasit Malaria Menggunakan Mikroskop Elektron	

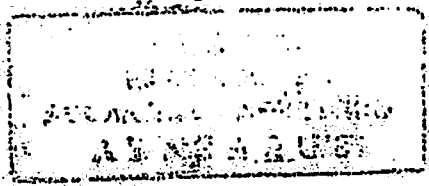
Transmisi	54
5.6 Efek Senyawa Cassiarin A hasil isolasi daun <i>C. siamea</i> pada proses endositosis parasit malaria	59
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	63
DAFTAR PUSTAKA	64

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil fraksinasi yang positif dengan penampak noda Dragendorff	37
Tabel 5.2 Hasil pemisahan dengan kromatografi preparatif dari daun <i>C. siamea</i> Lamk	38
Tabel 5.3 Data spektrum RMI- ¹ H dan RMI- ¹³ C isolat 2	39
Tabel 5.4 Persen penghambatan cassiarin A terhadap pertumbuhan <i>P. falciparum</i> dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam	41
Tabel 5.5 Persen stadium parasit pada pemberian Cassiarin A dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam	44
Tabel 5.6 Persentase hambatan tiap stadium dari parasit setelah pemberian senyawa cassiarin A dosis 0.1 µg /ml dibandingkan dengan kontrol negatif	46
Tabel 5.7 Hasil uji hambatan pada proses endositosis dari senyawa cassiarin A dosis 0,1 µg/ml terhadap <i>P. falciparum</i> 3D7	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambar pohon (A), bunga (B) dan daun <i>C. siamea</i> Lamk (C)	4
Gambar 2.2 Struktur kimia beberapa kandungan senyawa dalam daun <i>C. siamea</i> Lamk	6
Gambar 2.3. Morfologi dari sitostoma, mulai dari cara membuka awal untuk invaginasi sampai masuknya hemoglobin	17
Gambar 2.4. Alur transport hemoglobin menuju vakuola makanan	18
Gambar 5.1 Skema hasil isolasi daun <i>C. siamea</i> Lamk	36
Gambar 5.2 Kromatogram hasil KLT kromatografi kolom menggunakan fase gerak kloroform : etanol (8,5:1,5) pada panjang gelombang 365 nm..	37
Gambar 5.3 Kromatogram hasil KLT kromatografi kolom menggunakan fase gerak kloroform : etanol (8,5:1,5) dengan penampak noda Dragendorff	37
Gambar 5.4 Kromatogram isolat 1 dan 3 dari pemisahan dengan kromatografi preparatif dari daun <i>C. siamea</i> Lamk menggunakan fase gerak CHCl ₃ : Metanol = 8 : 2 dengan penampak noda Dragendorff	38
Gambar 5.5 Grafik tingkat parasitemia <i>P. falciparum</i> 3D7 yang diinkubasi senyawa aktif cassiarin A pada waktu pengamatan 0, 12, 24 dan 48 <i>in vitro</i>	42
Gambar 5.6 Gambaran penurunan parasitemia dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 1000x.	43
Gambar 5.7 Grafik persen parasitemia berdasarkan stadium pertumbuhan <i>P. falciparum</i> 3D7 yang diberikan cassiarin A pada waktu pengamatan 0, 12, 24 dan 48 jam secara <i>in vitro</i>	44
Gambar 5.8 Morfologi <i>P. falciparum</i> 3D7 setelah diinkubasi selama 12 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 2500x.	47
Gambar 5.9 Morfologi <i>P. falciparum</i> 3D7 setelah diinkubasi selama 24 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 2500x.	49
Gambar 5.10 Perubahan morfologi stadium trofozoit <i>P. falciparum</i> (strain 3D7) setelah masa inkubasi 24 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 4000x.	50
Gambar 5.11 Morfologi <i>P. falciparum</i> 3D7 setelah diinkubasi selama 48 jam menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 2500x	51
Gambar 5.12 Hasil ultra struktur parasit normal diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi	55
Gambar 5.13 Hasil ultra struktur parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 µg/ml dengan masa inkubasi 12 jam diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi.	56
Gambar 5.14 Hasil ultra struktur parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 µg/ml dengan masa inkubasi 24 jam diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi	57
Gambar 5.15 Penghambatan proses endositosis pada parasit <i>P. falciparum</i> 3D7 ...	61



BABI PENDAHULUAN

Malaria sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius. Dilaporkan pada tahun 2006 terdapat 247 juta kasus malaria dari 3,3 miliar penduduk dunia yang berisiko terkena malaria yang menyebabkan hampir 1 juta kematian. Data terbaru lainnya menyebutkan sebanyak 109 negara dinyatakan sebagai wilayah endemik untuk penyakit malaria dalam tahun 2008 (WHO, 2008).

Pada tahun 1998, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah meluncurkan suatu kampanye penanggulangan malaria yang dimotori oleh PBB, yaitu *Roll Back Malaria* (RBM) yang bertujuan menurunkan angka kematian malaria sampai separuh dari yang ada pada saat itu, pada tahun 2010. Saat ini RBM telah bekerja separuh jalan, namun statistik WHO menunjukkan bahwa angka kematian malaria cenderung meningkat (Attaran, 2004).

Angka kesakitan malaria di Indonesia dilaporkan juga meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 2000 dilaporkan 2,76 per 1000 penduduk sedang pada tahun 2005 meningkat menjadi 4,02 per 1000 penduduk. Indonesia menduduki peringkat ke 26 di antara negara-negara di dunia yang endemik malaria dengan prevalensi sekitar 919,8 per 100.000 penduduk (WHO, 2007). Departemen Kesehatan RI melaporkan bahwa terdapat lebih dari 15 (lima belas) juta penderita malaria klinis tiap tahun dengan rata-rata kematian 30.000 orang, yang sebagian besar terjadi di Indonesia bagian timur (Depkes RI, 2007).

Upaya penanggulangan terhadap penyakit ini memang telah banyak dilakukan, namun angka kesakitan dan kematian malaria di beberapa negara masih tinggi. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, misalnya konflik antar penduduk, migrasi manusia secara besar-besaran,

perubahan iklim dan lingkungan, sistem pelayanan kesehatan yang kurang baik, serta timbulnya galur parasit malaria yang resisten terhadap obat antimalaria dan galur nyamuk *Anopheles* yang resisten terhadap insektisida (Fahmi dan Khairunnisa, 2009; Martins *et al.*, 2009).

Tumbuh dan menyebarnya resistensi terhadap semua obat antimalaria lapis pertama (*front-line antimalarial compound*) yang dipakai pada pengobatan dan pencegahan malaria telah menimbulkan banyak masalah pada program penanggulangan malaria. Seiring dengan belum berhasilnya upaya untuk menemukan vaksin malaria yang ideal, maka aktivitas riset yang bertujuan untuk penemuan obat baru dan mengidentifikasi target intervensi kemoterapi tetap menjadi tujuan utama dalam upaya penanggulangan malaria. Obat baru yang terjangkau bagi masyarakat di daerah penularan malaria sangat mutlak diperlukan bila dampak malaria ingin dikurangi atau bahkan diatasi (Burke, 2003; Sjafruddin, 2004).

Berbagai hal tersebut di atas telah mendorong eksplorasi dan isolasi tanaman obat yang diduga mengandung senyawa aktif antimalaria. Di Indonesia, salah satu tumbuhan yang telah diakui secara tradisional dapat mengobati malaria adalah *Cassia siamea* (johar). (Heyne, 1987). Peneliti telah menguji aktivitas daun *C. siamea* berdasar senyawa kandungan kimia yang diduga ada pada daun *C. siamea* dengan hasil memuaskan (Wiwied, 2005; Wiwied, 2006). Dari hasil tersebut peneliti telah melanjutkan dengan mengisolasi senyawa aktif daun *C. siamea* ini dan didapatkan senyawa cassiarin A dari golongan alkaloid mempunyai aktivitas anti malaria yang paling potensial dibandingkan isolat lainnya (Wiwied, 2009). Untuk mendapatkan efek pengobatan yang optimal diperlukan data waktu dan stadium suatu senyawa bekerja sebagai antimalaria. Hambatan suatu senyawa pada fase tropik dimana pertumbuhan parasit dari trofozoit dan shizont tidak membentuk stadium cincin, sangat prospektif, karena dapat dikembangkan sebagai obat antimalaria yang berefek shizontosidal darah. Begitu pula efek kerja

suatu senyawa perlu dikonfirmasi pada perubahan morfologi dari parasit sehingga diketahui dengan tepat cara kerja perusakannya. Selanjutnya jalur penghambatan pada proses pengambilan hemoglobin diawali pada proses endositosis yang kemudian dilanjutkan dengan pemecahan hemoglobin dan detoksifikasi heme. Untuk mendapatkan data lengkap efek cassiarin A pada jalur hemoglobin maka perlu pula diketahui efeknya pada penghambatan proses endositosis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tanaman *C. siamea* Lamk

2.1.1 Klasifikasi tanaman

Suku : Caesalpiniaceae

Marga : *Cassia*

Jenis : *Cassia siamea* Lamk (Backer and Backhuizen, 1963)

Nama daerah : Johar, Juwar (Heyne, 1987)



(A)



(B)



(C)

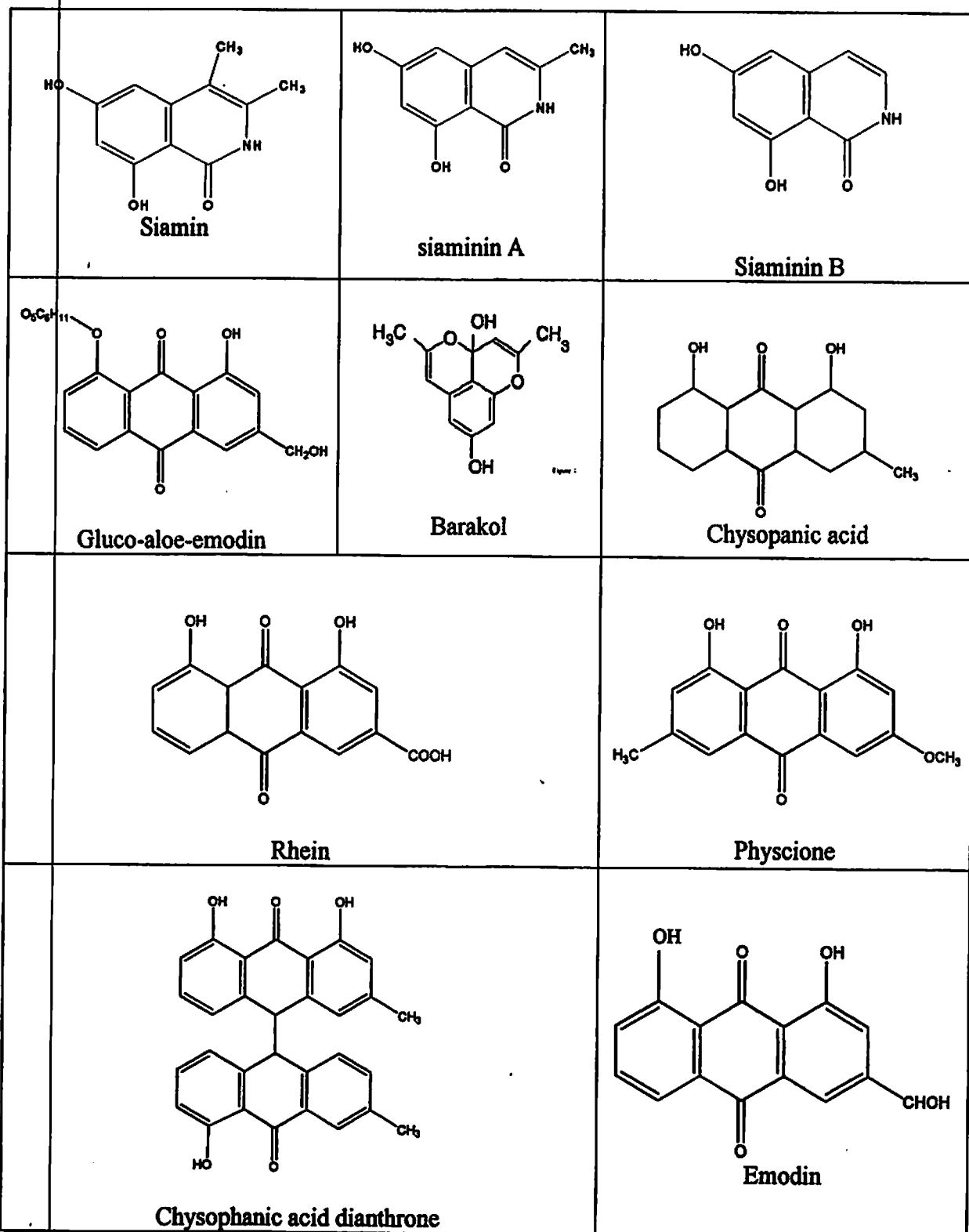
Gambar 2.1 Gambar pohon (A), bunga (B) dan daun *C. siamea* Lamk (C)

2.1.2 Kandungan *C. siamea* Lamk

Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman *C. siamea* Lamk antara lain (Varshney, 1977; El-Sayyad *et al.*, 1984; Depkes RI, 1989; Tripathi and Gupta, 1991; Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992; Padumanonda, 2006):

- Pada daun : barakol, anhydrobarakol, p-coumaric acid, siamin, siaminin A, siaminin B, 3-methyl-6-8-dihydroxyisoquinol-1-one, apigenin-7-O-galactoside, isorhametin, kaemferol, rhein, physcion 5-acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone, chrysopanic acid, chrysophanol, gluco-aloe emodin, rhein-8-glucoside, 1,2-dimethyl-5-acetonyl-7-hydroxychromone, aloe-emodin, kaempferin, cassiamine A, beta-sitosterol, apigenin, cassiachromone, anthrone and chysophanic acid dianthrone
- Pada kayu/ batang : tannin, antrakuinon, lignin, pentosa hidrosianat
- Pada bunga : senyawa alkaloid inti kromon, yaitu cassia denindihidro-isokumarin, asam kumarat, sterol, methyl-6-8-dihydroxyisoquinol-1-one, D-sukrose, anhydrobarakol hydrochloride, 5-acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone, beta-sitosterol, lupeol, arabinose, kolesterol, 24-methyl-kolesterol, cycloartenol, fructose, glucose, (+)-pinitol, siamine dan stigmasterol
- Pada buah : antrakuinon, krisopanol

Berikut adalah struktur kimia beberapa kandungan senyawa dari daun *C. siamea* Lamk:



Gambar 2.2 Struktur kimia beberapa kandungan senyawa dalam daun *C. siamea* Lamk

2.1.3 Bioaktivitas *C. siamea* Lamk sebagai antimalaria

Penelitian terhadap *C. siamea* Lamk yang berkaitan dengan aktivitasnya terhadap penghambatan parasit malaria telah dilakukan oleh beberapa peneliti.

1. Gbeassor *et al.* (1989) telah menguji efek antimalaria ekstrak air dari 8 tanaman di Afrika, di antaranya adalah *C. siamea* Lamk dan dinyatakan bahwa tanaman ini dapat menghambat 100% pertumbuhan *P. falciparum*.
2. Purwanto (1997) mengekstraksi daun *C. siamea* Lamk menggunakan tiga macam pelarut yaitu n-heksana, kloroform dan metanol. Dari uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* diketahui harga IC_{50} ekstrak n-heksana = 461,9553 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak kloroform = 260,9156 $\mu\text{g/ml}$ dan untuk ekstrak metanol = 1,8433 $\mu\text{g/ml}$.
3. Hadi (1997) meneliti aktivitas ekstrak n-heksana, kloroform dan metanol dari kulit batang *C. Siamea* Lamk terhadap *P. falciparum*, didapatkan hasil yaitu untuk n-heksana IC_{50} = 1893,75 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak kloroform IC_{50} = 959,83 $\mu\text{g/ml}$ dan ekstrak metanol = 36,14 $\mu\text{g/ml}$.
4. Ekasari *et al.* (2001) telah melakukan uji antimalaria *in vitro* dari ekstrak etanol, ekstrak kloroform, serta fraksi positif alkalod hasil fraksinasi ekstrak kloroform daun *C. siamea* Lamk dan didapatkan hasil bahwa harga IC_{50} dari ekstrak etanol adalah 7,06 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak kloroform = 2,41 $\mu\text{g/ml}$ dan fraksi positif alkaloid adalah 1,70 $\mu\text{g/ml}$.
5. Ekasari *et al.* (2004) telah menguji daya hambat ekstrak etanol, ekstrak kloroform dan fraksi alkaloid total daun *C. siamea* Lamk terhadap *P. berghei* secara *in vivo*. Didapatkan hasil bahwa harga ED_{50} semakin menurun (semakin potensial) seiring dengan makin

murninya bahan yaitu: ED₅₀ ekstrak etanol sebesar 34,69 mg/kgBB, ekstrak kloroform = 19,59 mg/kgBB dan fraksi alkaloid total sebesar 0,47 mg/kgBB.

6. Ekasari *et al.* (2005) telah menguji antimalaria hasil fraksinasi ekstrak kloroform daun *C. siamea* Lamk pada mencit terinfeksi *P. berghei*. Didapatkan hasil Fraksi I (positif terpenoid) = 0,58798 mg/kgBB, Fraksi II = 8,43313 mg/kgBB, Fraksi III = 6,93726 mg/kgBB, Fraksi IV = 16,5014 mg/kgBB dan Fraksi V (positif alkaloid) = 0,25288 mg/kgBB.
7. Ekasari *et al.* (2006) telah menguji aktivitas fraksi etil asetat daun johar (*C. siamea* Lamk) secara *in vitro* pada *P. falciparum* dan *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei*. Hasil yang didapat adalah aktivitas antimalaria secara *in vitro* = 1,93 µg/ml dan aktivitas antimalaria secara *in vivo*: 3,803 mg/kgBB.

2.2 Senyawa Alkaloid dan Aktivitasnya sebagai Antimalaria

Obat malaria yang paling tua yang berasal dari bahan alam adalah kinina. Alkaloid yang pada tahun 1820 berhasil diisolasi dari kulit pohon *Chinchona sp.* yang semenjak abad ke 17 digunakan di Amerika Selatan sebagai obat tradisional terhadap penyakit malaria.

Telah pula berhasil diisolasi senyawa alkaloid dari tanaman *Dichroea febrifuga* (Saxifragaceae) yang dikenal dengan nama febrifugina dan isofebrifugi yang setelah diuji *in vitro* dapat menghambat pertumbuhan *P. gallinaceum* dan *lophurae*. Tanaman ini bahkan telah dicoba secara klinik pada penderita malaria tertiana (Chang and Hay-But, 1986).

Berberina, senyawa alkaloid isokuinolina yang banyak terdapat di dalam beberapa suku tanaman, juga telah lama digunakan sebagai antimalaria. Berberina, palmatina, jatrorrhizina dan kolumbani telah diuji aktivitasnya secara *in vitro* terhadap *P. falciparum* yang diisolasi dari

pasien dan didapatkan harga IC_{50} yang berkisar antara 0,14 – 1,61 $\mu\text{g/ml}$ (Phillipson and Wright, 1991).

Kemudian dari upaya untuk mengetahui aktivitas 18 tanaman yang biasa digunakan di Sierra Leone sebagai antimalaria didapatkan satu tanaman yang mempunyai aktivitas tertinggi yaitu *Triclisia patens* (Menispermaceae) dan setelah diisolasi senyawa aktifnya didapat senyawa bisbenzilisokuinolina alkaloid. Selanjutnya ternyata dari 25 senyawa bisbenzilisokuinolina berbagai tanaman yang diuji aktivitasnya secara *in vitro*, semuanya dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dengan harga IC_{50} berkisar 0,1-45 $\mu\text{g/ml}$. Sementara pada kondisi percobaan yang sama untuk klorokuin difosfat didapatkan harga IC_{50} sebesar 0,14 $\mu\text{g/ml}$ (Phillipson and Wright, 1991). Hallock *et al.* (1994) berhasil mengisolasi alkaloid isokuinolina yaitu korundamin A dari tumbuhan *Ancistrocladus korupensis* dan terbukti berhasil menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*, begitu pula dengan Perez *et al.* (2004) yang berhasil mengisolasi senyawa alkaloid isokuinolina dari *Duguetia vallicola* juga mempunyai aktivitas antiplasmodial.

2.3 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam

Ekstraksi suatu bahan tanaman tergantung pada tekstur dan kandungan air dari bahan tersebut dan juga senyawa yang akan diisolasi. Pada umumnya pelarut yang digunakan adalah pelarut yang non polar sedikit demi sedikit meningkat sampai dengan yang paling polar. Pelarut non polar yang sering digunakan misalnya petrolium eter dan heksana. Pelarut yang semi polar misalnya eter, kloroform dan diklorometana. Sedangkan pelarut yang bersifat polar misalnya etanol, air atau campuran keduanya. Zat-zat kimia yang dapat terekstraksi dengan pelarut non polar adalah minyak atsiri, lemak, steroid dan karotenoid. Zat-zat kimia yang terekstraksi dengan

pelarut semi polar adalah senyawa-senyawa alkaloid bebas, asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid, antrakinon, xanton dan stilben. Sedangkan zat-zat kimia yang dapat terekstraksi dengan pelarut polar adalah garam-garam alkaloid, glikosida, saponin dan tanin (Depkes RI, 1987). Ekstraksi yang didasarkan pada perbedaan kepolaran senyawa kandungan ini berguna untuk telaah profil fitokimia dari suatu tumbuhan sebelum dilakukan kromatografi atau pemisahan selanjutnya (Harborne, 1996).

Kata "ekstraksi" berasal dari bahasa Latin "*extractio*" atau "*extrahere*" yang berarti "menarik-keluar". Yang 'ditarik-keluar' adalah senyawa-senyawa kimia (misalnya senyawa aktif) dari jaringan tumbuhan atau hewan. Untuk ekstraksi alkaloid, biasanya apabila dalam bentuk alkaloid basa dapat ditarik/larut dalam pelarut dengan polaritas yang sedang sampai tinggi (misal: aseton, etilasetat, eter, kloroform), sedangkan garam alkaloid larut dalam air atau alkohol rendah (misal: metanol, etanol). Untuk pengekstraksian alkaloid, memakai maserasi atau perkolasi adalah yang terbaik. Ekstraksi biasanya dibawa dalam air bersuasana asam dan ekstraksi kembali dengan eter atau kloroform setelah dibuat dalam larutan basa.

Prosedur isolasi senyawa dari tumbuhan juga sangat beragam sesuai dengan ragam zat kandungan yang akan diisolasi. Salah satu hal yang harus diperhatikan adalah menghindari kerusakan zat kandungan karena panas atau reaksi enzimatik. Untuk pemurnian senyawa, metode kromatografi merupakan metode yang paling disukai (Robinson, 1983). Kromatografi yang sering digunakan antara lain kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom.

2.3.1 Kromatografi

Kromatografi adalah cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan dengan jalan penyarian berfraksi, penyerapan atau penukaran ion pada zat berpori dengan menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Sekarang kromatografi mencakup berbagai proses

yang didasarkan pada perbedaan distribusi dari penyusun cuplikan antara dua fase. Satu fase tetap tinggal pada sistem dan dinamakan fase diam. Fase lainnya dinamakan fase gerak, memperlakikan melalui celah-celah fase diam. Gerakan fase gerak akan menyebabkan perbedaan migrasi dari penyusun cuplikan (Stahl, 1985).

2.3.1.1 Kromatografi lapisan tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah teknik pemisahan campuran zat berdasarkan atas perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponennya pada fase diam (berupa bahan inert) di bawah suatu pelarut sebagai fase gerak. Campuran yang dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan berbentuk bercak atau pita, kemudian dikembangkan dalam bejana dengan larutan pengembang yang sesuai. Campuran senyawa kimia tersebut akan bergerak melintasi fase diam dengan kecepatan yang berbeda tergantung kelarutannya pada pelarutan pengembang dan kecenderungan senyawa tersebut melekat pada fase diam (Stahl, 1985; Gritter, 1991).

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada kromatogram adalah harga R_f (*Retardation factor*), yaitu hasil bagi jarak noda dari titik awal dengan jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal. Setiap zat akan memiliki harga R_f yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1981). KLT digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut (Markham, 1988). Macam-macam fase diam yang sering digunakan di KLT adalah silika gel, selulosa, aluminium oksida, dan magnesium silikat. Pemilihan jenis fase diam dipengaruhi oleh prinsip pemisahan yang diinginkan dan senyawa yang ingin dipisahkan. Misalnya untuk memisahkan alkaloid maka

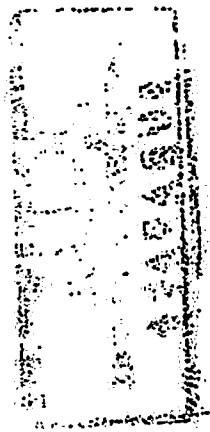
sebaiknya menggunakan jenis fase diam silika gel, aluminium oksida, atau magnesium silikat . KLT juga merupakan metode yang peka sehingga apabila diperlukan dapat dipakai untuk memisahkan bahan yang jumlahnya kecil sampai ukuran mikrogram (Harborne, 1996).

2.3.1.2 Kromatografi kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu metode kromatografi yang dapat digunakan untuk memfraksinasi campuran senyawa dalam skala besar. Pada kromatografi kolom, dibutuhkan kolom pemisah berupa suatu tabung yang diisi dengan bahan pengabsorpsi dan pelarut pengembang yang berbeda. Sampel dilarutkan dalam pelarut sesedikit mungkin dan pelarut ini sama dengan pelarut yang digunakan untuk mengeluasi. Sampel yang berbentuk kental juga dapat disiapkan, yaitu mencampur sampel dengan silika gel. Selanjutnya dilakukan eluasi dengan pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan untuk mengeluasi pada kromatografi kolom umumnya merupakan pelarut atau campuran pelarut, dimulai dari yang paling kurang polar sampai ke yang paling polar. Perbandingan cuplikan dengan kolom yang baik berkisar antara 1 : 50 sampai 1 : 500 (Harborne, 1987; Roth and Blascke, 1988). Dengan menggunakan cara kromatografi kolom, skala pemisahan dapat ditingkatkan hampir ke skala industri (Markham, 1981). Dengan kromatografi kolom, campuran zat-zat kandungan dapat dipisahkan menjadi fraksi-fraksi yang cukup jumlahnya untuk dilakukan berbagai uji aktivitas (Robinson, 1995). Untuk isolasi, penggunaan cara ini dapat menghasilkan senyawa murni dalam skala gram (Harborne, 1996).

2.4 Tinjauan tentang Spektroskopi

Teknik spektroskopik adalah salah satu teknik analisis fisiko-kimia yang mengamati tentang interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Pada prinsipnya



interaksi REM dengan molekul akan menghasilkan satu atau dua macam dari tiga kejadian yang mungkin terjadi. Ketiga macam kejadian yang mungkin terjadi sebagai akibat interaksi atom molekul dengan REM adalah hamburan, absorpsi dan emisi REM oleh atom atau molekul yang diamati (Mulja, 1995).

2.4.1 Spektroskopi infra merah

Metode spektroskopi infra merah merupakan suatu metode yang meliputi teknik serapan, emisi dan fluoresensi. Metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang belum diketahui, karena spektrum yang dihasilkan spesifik untuk senyawa tersebut. Metode ini banyak digunakan karena cepat dan relatif murah, dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsional dalam molekul dan spektrum infra merah yang dihasilkan adalah khas dan oleh sebab itu dapat menyajikan sebuah finger print (sidik jari) untuk senyawa tersebut.

Senyawa yang dianalisis dapat dilarutkan dalam kloroform atau CCl_4 , berupa gerusan dalam minyak nujol atau zat dicampur homogen dengan kalium bromida (KBr) kemudian dikompresi sampai terbentuk cakram tipis yang transparan (Harborne, 1987).

Serapan infra merah dapat dipisahkan menjadi pita-pita serapan antara 4000 sampai 1300 cm^{-1} yang disebut wilayah serapan gugus fungsional. Pita-pita serapan dari gugus-gugus fungsional penting seperti OH, NH dan CO terdapat di dalam wilayah ini. Wilayah antara 1300 sampai 900 cm^{-1} biasanya disebut sebagai wilayah "sidik jari" karena serapan pada wilayah ini khas untuk tiap-tiap molekul. Wilayah serapan antara 900 sampai 650 cm^{-1} merupakan wilayah serapan aromatik. Tidak adanya serapan yang kuat pada wilayah ini menunjukkan tidak adanya gugus aromatik dalam molekul senyawa yang dianalisis (Silverstein and Webster, 1998).

2.4.2 Spektroskopi resonansi magnetik inti (RMI)

Spektrometri resonansi magnetik inti (RMI) merupakan instrumen yang sangat penting untuk memperoleh informasi senyawa kimia. Gambaran yang merupakan hasil spektroskopi RMI penting dalam pemantauan senyawa kimia baik itu struktur senyawa dari bahan alam yang belum diketahui, konformasi hormon peptida, maupun oligomer dinamis internal. (Jenis *et al.*, 2005).

Prinsip dasar RMI didasarkan pada penemuan bahwa semua inti bermuatan akan mengalami spin atau (perputaran) pada sumbu inti dan menghasilkan suatu dipol magnet sepanjang sumbu dengan momentum magnetik μ . Apabila inti tersebut diletakkan pada suatu medan magnet kuat, akan mengalami rotasi atau spin pada sumbu inti dan energi inti unsur tersebut akan pecah menjadi dua tingkat energi terkuantisasi atau lebih sebagai akibat sifat magnet inti tersebut. Transisi antara tingkat-tingkat energi yang terjadi karena diinduksi medan magnet dapat terjadi apabila mengabsorpsi radiasi elektromagnet dengan frekuensi yang tepat atau sama.

Di alam terdapat inti-inti atom yang mempunyai spin (misalnya ^1_1H dan $^{13}_6\text{C}$) dan yang tidak mempunyai spin (misal $^{12}_6\text{C}$ dan $^{16}_8\text{O}$). Yang dimanfaatkan dalam RMI adalah inti-inti yang mempunyai spin dan yang paling lazim dipelajari adalah ^1_1H (proton). Suatu inti yang mempunyai spin akan berputar dan menghasilkan medan magnet kecil yang disebut momen magnetik inti (Jenis *et al.*, 2005).

Apabila suatu molekul yang mengandung atom hidrogen diletakkan dalam suatu medan magnet luar (H_0), maka momen magnetik dari tiap proton akan berada pada salah satu orientasi, yaitu paralel (searah) atau antiparalel (berlawanan arah) terhadap medan luar tersebut. Suatu keadaan pada orientasi paralel dikatakan berenergi lebih rendah dibandingkan dengan keadaan

antipararel. Apabila dikenai gelombang radio yang frekuensinya sesuai, proton pararel akan menyerap energi dan membalik menjadi keadaan antipararel. Proton tersebut dikatakan berada dalam keadaan resonansi. Besarnya energi yang diperlukan untuk beresonansi sebanding dengan besarnya H_0 (Silverstein and Webster, 1998).

Pada H_0 tertentu, proton-proton akan beresonansi pada radio frekuensi yang berbeda-beda karena proton tidak hanya mengalami H_0 tetapi juga mengalami medan magnet molekul imbasan, yakni medan magnet kecil yang terimbas oleh H_0 . Besarnya medan magnet imbasan ini tidak sama karena proton-proton dalam suatu molekul mempunyai lingkungan kimia dan magnetik yang berlainan. Karena medan magnet yang sebenarnya dialami oleh setiap proton adalah gabungan antara H_0 dan medan magnet molekul imbasan, maka untuk beresonansi diperlukan energi (radio frekuensi) yang berbeda-beda, sehingga dapat diperoleh suatu spektrum (Silverstein and Webster, 1998).

2.5 Tinjauan Uji Aktivitas Antimalaria secara *In Vitro*

Untuk pengujian antimalaria dari ekstrak tumbuhan atau isolat hasil kolom, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas tehnik dari Rieckmann dkk yang kemudian disempurnakan oleh WHO tahun 1982 (WHO, 1985). Bahan Uji dilarutkan dalam DMSO, diencerkan sampai kadar tertentu dalam medium RPMI 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO_3 . Larutan disterilkan dengan saringan diameter $0,45\mu\text{m}$ dan diencerkan secara seri. Masing-masing lempeng sumur mikro diisi dengan larutan bahan uji dan ditambahkan 180 μL suspensi 10% eritrosit dengan parasitemia 1% sehingga masing-masing sumur berisi 200 μL medium yang mengandung serum dan bahan uji yang diteliti. Lempeng sumur mikro diletakkan dalam desikator kaca yang diberi lilin yang berguna untuk menghilangkan oksigen. Lilin

dinyalakan, desikator ditutup, sementara kran udara pada tutup desikator dibuka. Setelah lilin padam, kran udara dibuka, diinkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37 °C selama 48 jam, kemudian dilakukan evaluasi hasil.

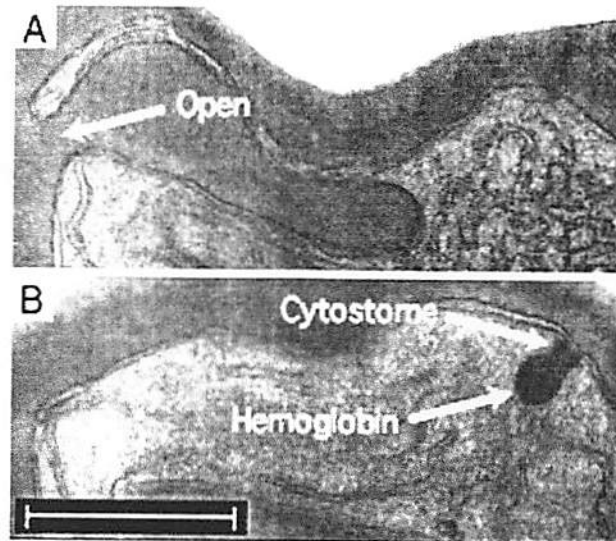
Setelah diinkubasi selama 48 jam, lempeng sumur mikro dikeluarkan, sediaan uji dicampur homogen dan disentrifuse, filtratnya dibuang dan bagian yang pekat dibuat sediaan lapisan darah tipis. Sediaan dikeringkan pada suhu kamar, difiksasi dengan metanol, kemudian setelah kering diwarnai dengan larutan giemsa 3% dalam pH 6,9 – 7,2 selama 1 jam. Evaluasi dilakukan dengan cara menghitung persen penghambatan (parasitemia) terhadap pertumbuhan *P. falciparum* terhadap 5.000 eritrosit (Noster, 1990).

Kemudian ditentukan harga IC₅₀ yaitu kadar dimana persen penghambatan terhadap *P. falciparum* sebesar 50% menggunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit persen penghambatan dengan logaritma kadar menggunakan persamaan garis regresi linier (Ratsimanaga, 1991).

2.6 Tinjauan tentang Endositosis

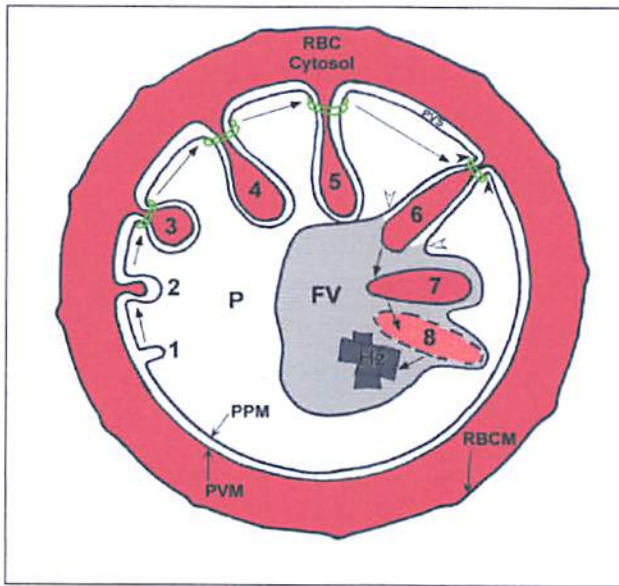
Morbiditas dan mortalitas penyakit malaria adalah hasil dari replikasi aseksual *Plasmodium* dalam aliran darah tubuh inang. Untuk perkembangan parasit dalam sel darah merah mulai dari stadium cincin menuju stadium trophozoit dan kemudian bereplikasi dalam stadium skizon, sejumlah besar hemoglobin dari sitosol sel darah merah dimasukkan. Endositosis adalah suatu proses untuk memperoleh substrat dalam hal ini hemoglobin untuk masuk ke dalam sel tanpa melalui membran sel. Seperti diketahui sewaktu parasit masuk dalam sel darah merah, parasit malaria mengendositosis sejumlah besar dari sitoplasma sel darah merah melalui invaginasi dari membran plasma parasit yang dikenal sebagai sitostoma. Setelah proses endositosis selesai, leher

dari sitostoma “dicopot” untuk melepas membrane ganda vesikel endositik untuk diisi dengan sitoplasma sel darah merah (Hong-chang *et al.*, 2009). Proses pencernaan sitoplasma dimulai oleh enzim pencernaan proteolitik dalam membran ganda dari transport vesikel. Membran terluar dari transport vesikel diperkirakan berasal dari invaginasi membran plasma parasit dan membran dalam berasal dari parasitophorus membran vakuola yang membungkus erat parasit dan melindungi dari sitoplasma sel darah merah. Hasil dari endositosis sitoplasma inang akhirnya dikirim ke vakuola makanan, yang dicerna pada pH antara 5 dan 5,5 (Hoppe *et al.*, 2004). Dari proses endositosis sel darah merah yang hampir seluruhnya terdiri dari hemoglobin, pemecahan proteolitik dalam vakuola makanan menghasilkan sejumlah besar bahan yang toksik yaitu heme. Heme ini oleh parasit selanjutnya didetoksifikasi dengan dipolimerisasi menjadi kristal hemozoin yang tidak toksik bagi parasit. Hambatan senyawa alkaloid terhadap proses endositosis dapat menyebabkan terhambatnya parasit untuk mendapatkan hemoglobin sebagai sumber nutrisinya, yang kemudian akan dapat menyebabkan kematian dari parasit.



Gambar 2.3. Morfologi dari sitostoma, mulai dari cara membuka awal untuk invaginasi sampai masuknya hemoglobin (Hoppe *et al.*, 2004)

Berikut ini adalah gambaran alur transport hemoglobin menuju vakuola makanan dari parasit.



Gambar 2.4. Alur transport hemoglobin menuju vakuola makanan (Lazarus *et al.*, 2008)
 Keterangan : Pembentukan sitostoma (1-3). (1) Membran parasitophorus vakuola (PVM) menginvaginasi setelah (2) membran parasit plasma (PPM) menginvaginasi terlebih dahulu. (3) Membran ganda *electron-dense collar* terbentuk mengelilingi sitostoma. (4-6) Pematangan sitostoma. (4) Sitostoma melanjutkan untuk mengisi dengan sitosol sel darah merah dan hemoglobin, dan (5) pemanjangan untuk berhadapan dengan vakuola makanan (FV) (6-8) Deposisi dan degradasi hemoglobin dalam vakuola makanan. (6) Terjadi penggabungan antara sitostoma matang dengan vakuola makanan (panah putih), disamping itu secara bersamaan sitostoma lepas dari Membran parasitophorus vakuola dan membran parasit plasma (panah hitam), menghasilkan (7) vesikel yang berisi hemoglobin dengan membran tunggal kedalam lumen vakuola makanan. (8) Membran vesikel di degradasi oleh enzim lipase - vakuola makanan, sedangkan hemoglobin didegradasi oleh enzim protease-vakuola makanan. Heme yang dihasilkan kemudian dipolimerisasi menjadi hemozoin (Hz).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 TUJUAN PENELITIAN

3.1.1. Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari senyawa Cassiarin A dan efeknya pada perubahan morfologi dari parasit *P. falciparum*.

3.1.2. Tujuan Khusus

Untuk mencapai hal tersebut maka dilakukan tahapan penelitian dengan tujuan khusus yaitu:

1. Mengisolasi senyawa Cassiarin A dari daun *C. siamea*.
2. Menguji aktivitas antimalaria senyawa cassiarin A daun *C. siamea* terhadap *P. falciparum* dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam
3. Mengetahui hambatan tiap stadium parasit pada pemberian Cassiarin A dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam
4. Mendapatkan data efek cassiarin A pada perubahan morfologi parasit menggunakan mikroskop cahaya
5. Mendapatkan data efek cassiarin A pada perubahan ultra struktur parasit menggunakan mikroskop elektron
6. Menguji efek senyawa aktif antimalaria hasil isolasi daun *C. siamea* pada proses endositosis parasit malaria.

3.2. MANFAAT PENELITIAN

3.2.1 Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang:

1. Isolasi dan identifikasi senyawa cassiarin A hasil isolasi daun *C. siamea*.
2. Aktivitas antimalaria senyawa cassiarin A pada masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam
3. Hambatan stadium yang terbesar dari senyawa cassiarin A
4. Efek dari cassiarin A pada perubahan morfologi dari parasit .
5. Efek cassiarin A pada proses endositosis parasit malaria

3.2.2 Manfaat praktis

1. Mendapatkan waktu dan stadium cassiarin A bekerja , cara kerja perusakannya serta mekanismenya sebagai antimalaria.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang obat antimalaria yang berasal dari tanaman sehingga memperkaya wacana tentang obat tradisional.
3. Untuk memacu penelitian yang berasal dari sumber daya alam nabati beserta pengembangannya terutama yang berkhasiat sebagai antimalaria.

BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dirancang selama satu tahun dengan tahapan – tahapan sebagai berikut:

1. Isolasi senyawa Cassiarin A dari daun *C. siamea*.
 - a. Pembuatan Ekstrak etanol dan Fraksi kloroform daun *C. siamea*
 - b. Pembuatan Fraksi alkaloid total daun *C. siamea* dengan kromatografi kolom vakum
 - c. Pemisahan komponen alkaloid daun *C. siamea* dengan kromatografi kolom lambat
 - d. Pemisahan senyawa alkaloid daun *C. siamea* dengan kromatografi preparatif
 - e. Identifikasi senyawa cassiarin A
2. Uji aktivitas antimalaria senyawa cassiarin A daun *C. siamea* terhadap *P. falciparum* dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam
3. Uji hambatan tiap stadium parasit pada pemberian Cassiarin A dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam
4. Mengamati efek cassiarin A pada perubahan morfologi parasit menggunakan mikroskop cahaya
5. Mengamati efek cassiarin A pada perubahan ultra struktur parasit menggunakan mikroskop elektron transmisi
6. Uji efek senyawa aktif antimalaria hasil isolasi daun *C. siamea* pada proses endositosis parasit malaria.

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan tanaman

Daun johar (*C. Siamea Lamk*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh di Kebun Raya Purwodadi. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka. Setelah kering kemudian digiling hingga menjadi serbuk.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi penelitian

Proses pelaksanaan ekstraksi dan isolasi senyawa daun *C. siamea* Lamk. dilakukan di Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Pembiakan parasit malaria dan pengujian aktivitas hambatan pertumbuhan parasit malaria *P. falciparum* strain 3D7 *in vitro* dilakukan di Laboratorium Malaria, Lembaga Biologi Molekuler, Eijkman Jakarta dan di Laboratorium Hewan-Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Februari tahun 2010 sampai dengan bulan Oktober tahun 2010

4.3 Prosedur Pengambilan/Pengumpulan Data

4.3.1 Persiapan sampel penelitian

4.3.1.1 Ekstraksi daun *C. siamea* Lamk

Serbuk daun *C. Siamea* Lamk diekstraksi dengan pelarut metanol kemudian hasil ekstrak disaring dan dipisahkan. Ekstrak metanol kemudian diekstraksi lagi dengan Etil asetat yang

mengandung 3% asam tartrat. Selanjutnya lapisan air yang didapat ditambah dengan Na_2CO_3 sampai pH sekitar 9-10 dan diekstraksi lagi dengan kloroform. Hasil ekstrak kloroform kemudian dikumpulkan dan diuapkan sampai pekat. Selanjutnya dilakukan pemisahan pada hasil sari kloroform dengan kromatografi kolom vakum.

4.3.1.2 Fraksinasi daun *C. siamea* dengan kromatografi cair vakum

Fase diam silika gel 60 (E.Merck) dimasukkan ke dalam *sintered glass* dalam keadaan kering. Ekstrak kloroform kemudian dicampur dengan silika gel (E. Merck) dan ditaburkan secara merata diatas permukaan silika gel dalam *sintered glass* yang telah dibasahi dengan pelarut. Ditutup kembali dengan silika gel 60, kemudian dilakukan eluasi dengan fase gerak yang merupakan campuran dari n-heksana-kloroform-etanol dengan berbagai perbandingan dengan volume masing-masing sebanyak 30 ml. Hasil kolom yang mempunyai kandungan sama kemudian digabung menjadi satu dan dilanjutkan pemisahannya dengan kromatografi kolom lambat.

4.3.1.3 Pemisahan komponen alkaloid

4.3.1.3.1 Kromatografi kolom lambat

Disiapkan kolom, ditimbang 1 g hasil fraksi positif alkaloid dan dimasukkan ke dalam kolom kemudian bagian atasnya ditutup dengan silika gel lagi. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan fase gerak campuran CHCl_3 : etanol (9 : 1). Fraksi yang positif alkaloid selanjutnya dilakukan lagi pemisahannya dengan kromatografi preparatif.

4.3.1.3.2 Pemisahan komponen alkaloid dengan kromatografi preparatif

Fraksi positif alkaloid hasil kolom lambat selanjutnya dilakukan pemisahannya lagi dengan menggunakan kromatografi preparatif dengan eluen CHCl_3 : Etanol (9 : 1).

4.3.2 Identifikasi isolat

Identifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan metode KLT, spektrometri UV-Vis, FTIR, RMI dan HRFAB-MS.

4.3.2.1 Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis

Bahan dalam bentuk cairan jernih di totolkan pada lempeng tipis silika gel kemudian di elusi dengan menggunakan CHCl_3 : Etanol (9 : 1). Identifikasi terhadap bercak yang muncul dilakukan dengan penampak noda Dragendorff dan lampu UV pada λ 254 dan 356 nm.

4.3.2.2 Identifikasi dengan spektrometri infra merah

Sejumlah kecil bahan digerus sampai homogen dengan kalium bromida bebas air. Kemudian dikompresi sampai terbentuk pelet yang transparan. Pelet ini dimasukkan ke dalam *sampel holder* dan direkam spektrumnya.

4.3.2.3 Identifikasi dengan spektrometri RMI

Kurang lebih 4 mg bahan dilarutkan dalam 0,5 ml CDCl_3 atau CD_3OD dan dimasukkan ke dalam tabung sampel. Kemudian dimasukkan alat di antara dua kutub magnet dan direkam spektrumnya.

4.3.3 Uji aktivitas antimalaria *in vitro*

4.3.3.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah *P. falciparum* strain 3D7

4.3.3.2 Klasifikasi variabel penelitian

1. Variable bebas: konsentrasi senyawa hasil isolasi dari daun *C. siamea* Lamk.
2. Variabel tergantung: persentase parasitemia.

4.3.3.3 Definisi operasional

1. Konsentrasi senyawa adalah 10; 1; 0,1; 0,01 dan 0,001 $\mu\text{g/ml}$.
2. Persentase parasitemia adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dalam 1000 eritrosit dalam persen (%).

4.3.3.4 Persiapan medium tak lengkap (*incomplete medium*)

Dibuat larutan steril yang terdiri dari 10,4 g RPMI-1640, 5,96 g HEPES, 2,1 g Natrium Bikarbonat, 0,05 g Hypoxantin, 0,5 ml Gentamycin dan aquabides ad 1000 ml. Kemudian larutan disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22 μm , dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4°C. Ini disebut juga medium pencuci (*washing medium*) dan bila akan digunakan, dimasukkan inkubator suhu 37 °C terlebih dahulu.

4.3.3.5 Persiapan serum

Diambil darah manusia golongan O dan diendapkan selama kira-kira 1 jam, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serum diambil dengan pipet pasteur dan diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit. Penyimpanan pada suhu -20°C dan bila akan digunakan, dihangatkan pada suhu 37°C.

4.3.3.6 Persiapan medium lengkap

Medium lengkap adalah medium yang mengandung 10% serum manusia. Medium ini dibuat dengan mencampur medium tak lengkap sebanyak 90 ml dengan 10 ml serum manusia. Medium ini digunakan untuk membiakkan *P. falciparum*.

4.3.3.7 Persiapan eritrosit 50%

Darah manusia golongan O yang diberi antikoagulan, dimasukkan dalam tabung dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Plasma dipisahkan dan leukosit dibuang. Eritrosit dicuci dengan medium pencuci 1-2 kali volume, disentrifus dengan kecepatan

3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali. Eritrosit yang telah dicuci (bebas dari leukosit) ditambah dengan medium lengkap dengan volume yang sama untuk membuat eritrosit 50% dan disimpan pada suhu 4°C. Eritrosit yang telah dicuci dapat disimpan pada suhu 4°C dan digunakan tidak lebih dari 3 minggu.

4.3.3.8 Prosedur biakan

Prosedur biakan ini didasarkan pada metode Trager dan Jensen (1976). Biakan dilakukan pada cawan petri dan dikerjakan secara aseptik. Parasit *P. falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap kloroquin, diperoleh dari simpanan beku yang di-*thawing* dengan cara berikut ini:

1. Tabung yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37°C. Ditambahkan larutan NaCl 3,5% dengan volume yang sama dan dipindahkan ke tabung sentrifus menggunakan pipet pasteur sambil dicampur perlahan.
2. Kultur disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dibuang.
3. Endapan disuspensikan dengan 5 ml medium tak lengkap, dicampur perlahan-lahan dengan pipet pasteur kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dibuang. Prosedur ini dilakukan sebanyak dua kali.
4. Setelah endapan dicuci, ditambahkan medium lengkap dan eritrosit 50% dicampur perlahan menggunakan pipet (sampai diperoleh hematokrit 10%).
5. Kultur dipindahkan ke dalam cawan petri, dimasukkan dalam *candle jar* dan selanjutnya disimpan di dalam inkubator yang bersuhu 37°C.
6. Selanjutnya dilakukan penggantian medium setiap hari. Bila tingkat parasitemianya lebih dari 5% dapat dilakukan sub biakan.

4.3.3.9 Penyiapan bahan uji

Sebagai bahan uji adalah senyawa yang dihasilkan dalam proses isolasi daun *C. siamea*. Ditimbang isolat sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dalam 10 μ l DMSO. Larutan ini merupakan larutan stok bahan uji. Penyiapan bahan uji ini dikerjakan pada kondisi aseptis.

4.3.3.10 Prosedur pengujian

1. Diambil 10 μ l larutan stok bahan uji dan ditambahkan medium lengkap sampai dengan 500 μ l.
2. Diisikan ke dalam sumur dari lempeng mikrotiter datar (24 lubang) sebanyak 1080 μ l medium lengkap, kecuali pada sumur untuk kontrol negatif. Kemudian tambahkan (a) sebanyak 120 μ l, dan dibuat serial dilution sehingga konsentrasi akhir pada sumur mikrotiter adalah 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 μ g/ml untuk fraksi dan 0,001; 0,01; 0,1; 1 dan 10 μ g/ml untuk isolat.
3. Sebanyak 100 μ l suspensi parasit dengan kadar parasitemia 1% dan hematokrit 5% ditambahkan kedalam tiap-tiap sumur mikrotiter tersebut. Kemudian diinkubasi di dalam *candle jar* selama 48 jam pada suhu 37 °C.

4.3.3.11 Evaluasi hasil uji efek antimalaria

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tipis dengan pewarnaan giemsa 20%. Kemudian setelah didiamkan selama 20 menit, dicuci dengan air dan dikeringkan. Selanjutnya dihitung persentase parasitemia dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1000 eritrosit di bawah mikroskop.

Persentase parasitemia dihitung dengan rumus :

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

Persentase penghambatan dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

X_p = Parasitemia perlakuan

X_k = Parasitemia kontrol

4.3.3.12 Analisa data

Aktivitas antimalaria dari bahan uji ditentukan dari nilai IC_{50} yaitu, kadar bahan uji dimana persentase penghambatan terhadap pertumbuhan parasit sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka aktivitas antimalaria semakin tinggi. Untuk menentukan nilai IC_{50} digunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (*probability unit*) prosentase penghambatan dengan logaritma kadar.

4.3.4 Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap kondisi morfologi parasit

4.3.4.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah *P. falciparum* strain 3D7.

4.3.4.2 Klasifikasi variabel penelitian

1. Variabel bebas : waktu inkubasi.
2. Variabel tergantung : perubahan morfologi.

4.3.4.3 Definisi operasional

1. Waktu inkubasi dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya adalah 0, 12, 24 dan 48 jam, sedang waktu inkubasi dengan pengamatan menggunakan mikroskop transmisi elektron adalah 12 dan 24 jam.
2. Perubahan morfologi yang diamati adalah dengan membandingkan morfologi parasit kontrol tanpa bahan uji dengan parasit yang telah diberi bahan uji menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop transmisi elektron.

4.3.4.4 Prosedur pengamatan dengan mikroskop cahaya

1. Kultur *P. falciparum* stadium cincin diinkubasi dengan senyawa aktif dengan parasitemia kurang lebih 1% dan 5% hematokrit pada lempeng multititer datar.
2. Kultur parasit dipanen pada jam 0, 12, 24 dan 48 jam pada masing-masing konsentrasi.
3. Selanjutnya dibuat hapusan tipis pada gelas objek dan difiksasi dengan metanol absolut.
4. Pewarnaan terhadap hapusan tipis parasit dilakukan menggunakan larutan giemsa 20% selama 20 menit.
5. Kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya.
6. Hapusan tipis masing-masing zat uji juga dihitung persen parasitemia selama waktu inkubasi yang dilakukan (0, 12, 24 dan 48 jam).

4.3.4.5 Prosedur pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi (Aikawa, 1971; Bozzola and Russell, 1999)

Pengujian efek isolat dan senyawa aktif terhadap biakan *P. falciparum* dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

1. Kultur *P. falciparum* stadium trophozoit awal diinkubasi dengan senyawa aktif (konsentrasi akhir 0,1 µg/ml) dengan parasitemia kurang lebih 1% dan 5% hematokrit.

2. Kultur parasit dipanen 100 µl pada jam ke 12 dan 24 pada masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan dengan dapar sodium cacodilat pH 7,4 sebanyak 500 µl disentrifus pada 3000 rpm selama 3 menit, untuk memisahkan jaringan dengan medium (dilakukan dalam keadaan dingin).
3. Filtrat dibuang kemudian ditambahkan lagi dengan dapar sodium cacodilat pH 7,4 sebanyak 500 µl disentrifus pada 3000 rpm selama 3 menit dan filtrat dibuang.
4. Pellet yang didapat kemudian difiksasi dengan glutraldehida 5% yang mengandung dapar cacodilat pH 7,4 dan sukrosa 3% selama 24 jam (disimpan pada suhu 4°C).
5. Setelah 24 jam, dibilas dengan dapar natrium cacodilat 0,1 M pH 7,4 selama 15 menit sebanyak 3 kali pada suhu 4°C.
6. Selanjutnya difiksasi akhir menggunakan osmium tetraoksida 2% dan kalium ferrisianida $K_3Fe(CN)_6$ dalam dapar cacodilat 0,1 M yang mengandung sukrosa 3% selama 2 jam pada suhu 4°C, setelah itu dicuci kembali dengan dapar selama 15 menit sebanyak 3 kali.
7. Jaringan yang telah melalui proses fiksasi kemudian didehidrasi dengan etanol konsentrasi bertingkat yaitu 10%, 20%, 30% selama masing-masing 5 menit dan 40, 50, 60, 70, 80% selama masing-masing 10 menit, etanol 95% selama 10 menit sebanyak 2 kali dan terakhir dengan etanol absolut selama 20 menit sebanyak 2 kali pada suhu 4°C.
8. Jaringan kemudian diinfiltrasi dengan propilenoksida dengan cara merendam dalam campuran etanol absolute dengan propilenoksida dengan perbandingan (2:1; 1:1; 1:2) dan selanjutnya dengan propilenoksida murni pada suhu ruang selama 30 menit.
9. Setelah itu jaringan direndam dalam campuran propilenoksida dan larutan Spurr (10 g *vinylcyclophene dioxide resin/VCD resin, diglycidyl ether* dalam 4,0 g *polypropylene glycol* DER-736, 26 g *nonenyl succinic anhydrate* (NSA), 0,4 g

dimethylaminoethanol (DMAE) dengan perbandingan 1:1 pada suhu ruang selama 30 menit.

10. Setengah volume campuran kemudian dibuang dan diganti oleh larutan Spurr dalam volume yang sama dan jaringan direndam dalam larutan Spurr murni dalam keadaan vakum pada suhu ruang selama 24 jam.
11. Setelah itu larutan perendam dibuang dan dibersihkan agar tidak ada larutan yang tersisa, kemudian jaringan direndam kembali dengan larutan Spurr murni yang dimasukkan dalam inkubator vakum suhu 70°C selama semalam. Persiapan ini akan menghasilkan blok jaringan dengan konsistensi bahan yang keras.
12. Kemudian sebagian bahan plastik pada permukaan blok dibuang agar jaringan yang akan diperiksa berada tepat di permukaan, selanjutnya pada permukaan blok dibuat bentuk trapezium.
13. Hasil potongan kasar diwarnai dengan toluidin biru (*toluidine blue*) untuk mencari bagian yang paling banyak mengandung sel dan permukaan potongan diperhalus dengan menggunakan alat *ultrathin*.
14. Jaringan dipotong dengan pisau *diamond* setebal 40-55 nm dan dilekatkan pada *grid* yang telah dilapisi *formvar* 5% dalam kloroform dan terdiri dari 200 *mesh*.
15. Hasil potongan diwarnai dengan uranil asetat, dilanjutkan *triple lead* kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi JEOL 1010.
16. Morfologi parasit *P. falciparum* dalam eritrosit yang telah diberi senyawa uji diamati dan dibandingkan dengan morfologi *P. falciparum* kontrol negatif (tanpa pemberian senyawa uji).

4.3.4.6 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan cara membandingkan bentuk morfologi dari parasit kontrol dengan parasit yang telah diberi isolat daun *C. siamea* Lamk.

4.3.5 Uji hambatan proses endositosis

4.3.5.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah *P. falciparum* strain 3D7.

4.3.5.2 Klasifikasi variabel penelitian

1. Variable bebas : jenis bahan uji.
2. Variabel tergantung : persentase endositosis.

4.3.5.3 Definisi operasional

1. Jenis bahan uji adalah media uji sebagai kontrol negatif, isolat daun *C. siamea* Lamk dan klorokuin difosfat sebagai kontrol positif.
2. Persentase endositosis adalah jumlah parasit yang berfluoresensi dibagi jumlah total parasit dalam persen (%) dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop fluoresensi.

4.3.5.4 Prosedur pengujian (Hong-Chang *et al*, 2009)

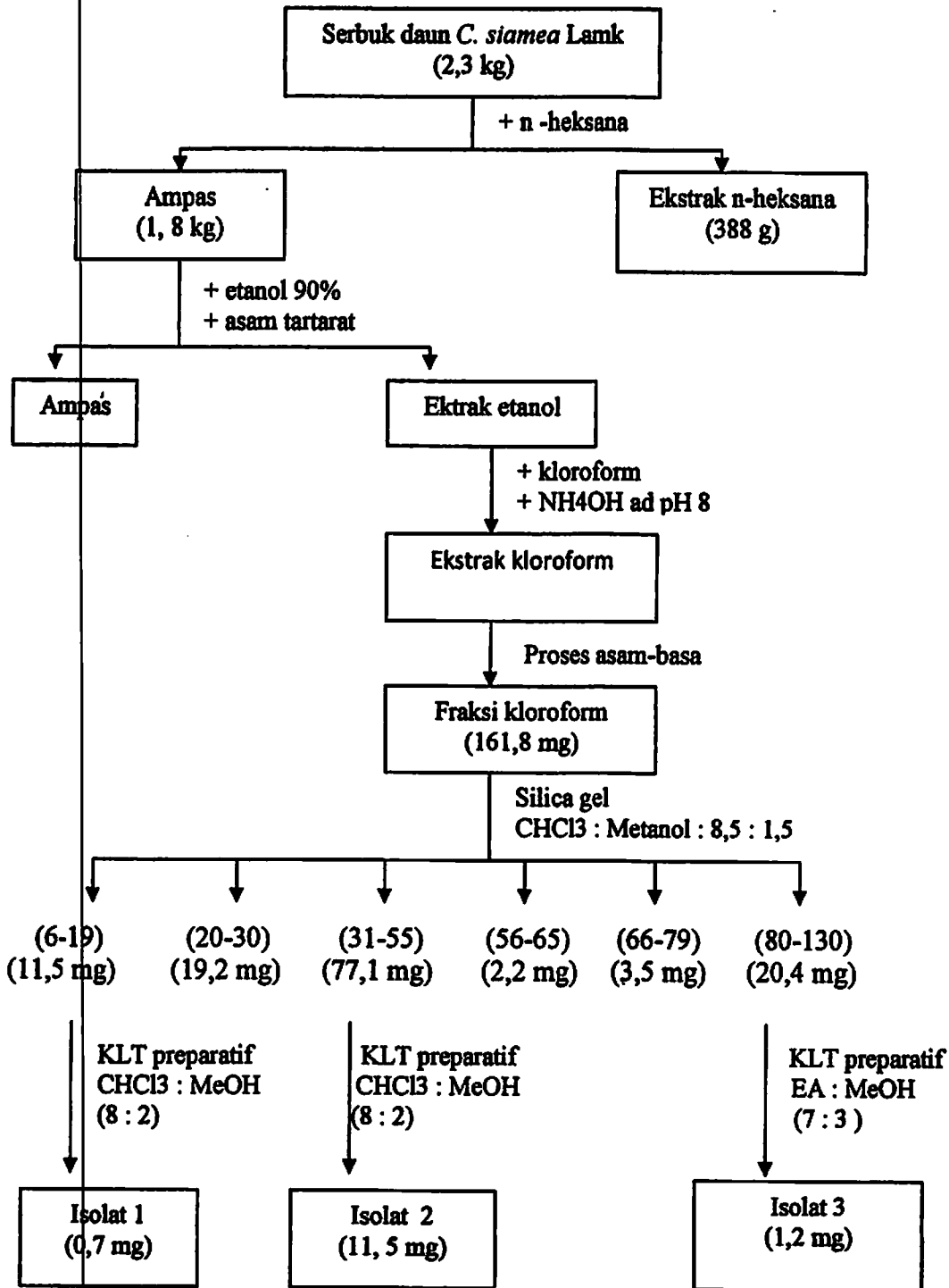
1. Disiapkan 25 ml larutan hipotonik yang terdiri dari 5 mM Hapes, 11 mM glukosa dan 2 mM MgCl₂.
2. Satu volume *packed* sel dicampur dengan 1,5 volume larutan hipotonik yang mengandung FITC-Dextran 1 mg/ml diinkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C.
3. 100 µl dari mature kultur parasit (stadium merozoit-ring) yang didapat dari hasil percoll dicampur dengan 1 ml larutan FITC-dextran-sel darah merah.

4. Selanjutnya dikultur kembali dengan penambahan media komplet sebanyak 12 ml dan diinkubasi dengan gas yg terdiri dari 3% CO₂ - 4% O₂ - 93% N₂ atmosphere (*Candle jar*) sampai parasit menjadi stadium cincin tua-trofozoit muda (4-8 jam).
5. Kultur kemudian dipakai uji dengan didistribusikan pada lempeng sumuran sebanyak 1 ml dengan penambahan bahan uji dan kembali diinkubasi selama 24 jam.
6. Setelah diinkubasi, kultur selanjutnya dipanen dan dilisis dengan PBS yang mengandung 0,1 % saponin selama 1 menit dan disentrifuse selama 3 menit pada 1500 rpm.
7. Supernatan selanjutnya diambil dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali.
8. Masing-masing bahan uji selanjutnya dibuat hapusan dan ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan cover glas, disimpan di suhu 4⁰ C dalam wadah tertutup/gelap.
9. Hasil selanjutnya diamati menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop fluoresensi.

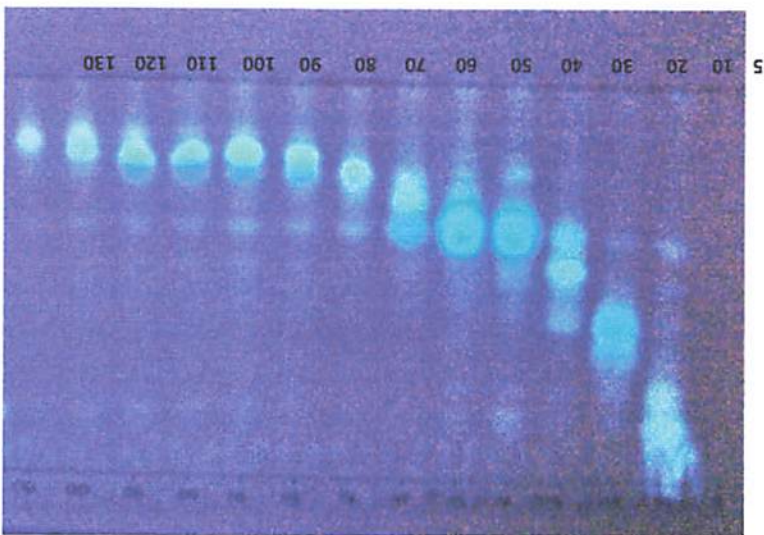
4.3.5.5 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan cara membandingkan persentase hambatan endositosis antara kontrol dengan isolat daun *C. siamea* Lamk.

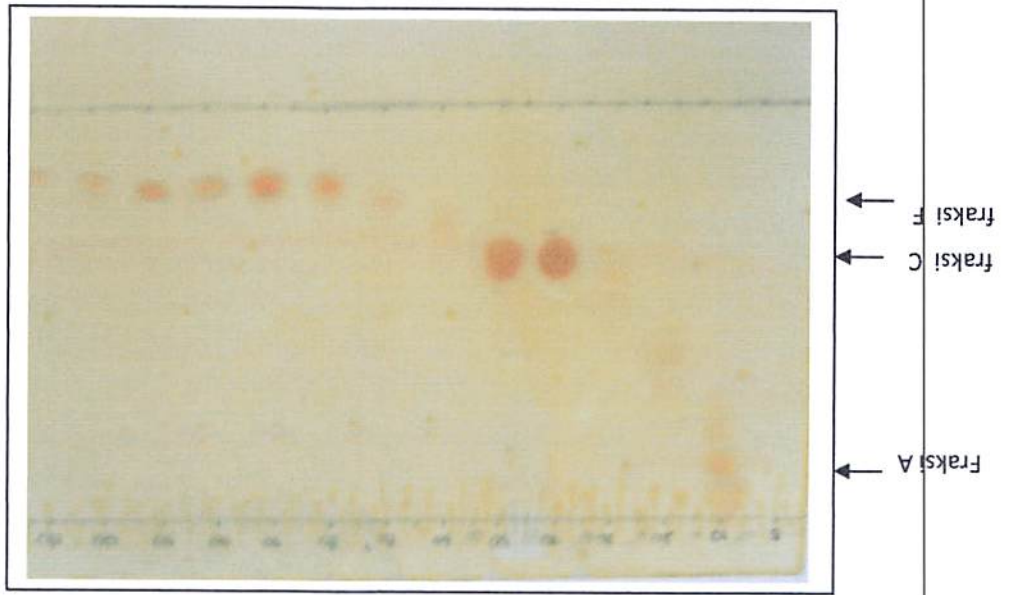
daun). Identifikasi secara KLT dengan menggunakan penampak noda Dragendorf menunjukkan isolat 1, 2 dan 3 adalah golongan alkaloid. Skema hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk dan kromatogram hasil KLT dapat dilihat berikut ini.



Gambar 5.1 Skema hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk



Gambar 5.2 Kromatogram hasil KLT kromatografi kolom menggunakan fase gerak kloroform : etanol (8,5:1,5) pada panjang gelombang 365 nm



Gambar 5.3 Kromatogram hasil KLT kromatografi kolom menggunakan fase gerak kloroform : etanol (8,5:1,5) dengan penampak noda Dragendorff

No	FRAKSI	JUMLAH (mg)
1.	A (6-19)	11,5
2.	C (31 - 59)	77,1
3.	F (80 - 130)	20,4

Tabel 5.1 Hasil fraksinasi yang positif dengan penampak noda Dragendorff

Fraksi-fraksi tersebut masing-masing kemudian dilakukan pemisahan dengan kromatografi preparatif menggunakan fase gerak yang terpilih. Untuk fraksi A dan C menggunakan fase gerak CHCl_3 : metanol = 8 : 2, sedang fraksi F menggunakan fase gerak etil asetat : metanol = 7 : 3. Hasil pemisahan dengan kromatografi preparatif dapat dilihat pada tabel 5.2.

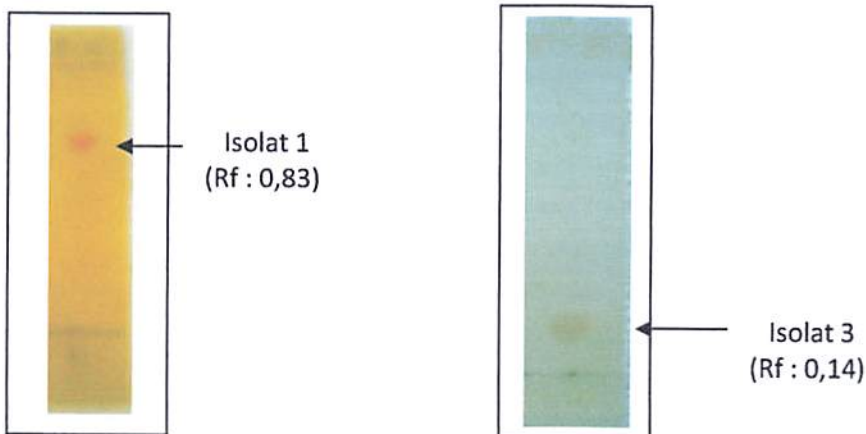
Tabel 5.2 Hasil pemisahan dengan kromatografi preparatif dari daun *C. siamea* Lamk

No	Isolat	JUMLAH (mg)
1.	1	0,7
2.	2	11,5
3.	3	1,2

5.1.2 Identifikasi isolat 1, isolat 2 dan isolat 3

5.1.2.1 Hasil identifikasi isolat 1 dan isolat 3

Untuk isolat 1 dan isolat 3 karena keterbatasan jumlah isolat yang didapat, isolat 1 sebesar 0,0007% dari berat serbuk daun kering (0,7 mg) dan isolat 3 sebesar 0,0013% (1,2 mg) maka identifikasi isolat hanya dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis yang hasilnya dapat dilihat di bawah ini.



Gambar 5.4 Kromatogram isolat 1 dan 3 dari pemisahan dengan kromatografi preparatif dari daun *C. siamea* Lamk menggunakan fase gerak CHCl_3 : Metanol = 8 : 2 dengan penampak noda Dragendorff

5.1.2.2 Hasil identifikasi isolat 2

5.1.2.2.1 Hasil identifikasi dengan metode spektrofotometri RMI

Gambar Spektrum RMI-¹H dan RMI-¹³C isolat 2 dalam CDCl₃/CD₃OD dari daun *C. siamea* Lamk menggunakan alat Bruker AV 400 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 1.1 dan lampiran 1.2, data spektrum dapat dilihat pada tabel 5.3 di bawah ini.

Tabel 5.3 Data spektrum RMI-¹H dan RMI-¹³C isolat 2

Posisi Karbon	δH	δC
2	-	161.5
3	6.03(1H,s)	103,7
4	-	150.6
4a	-	111.5
5	-	138.8
6	6.46 (1H,s)	102.9
7	-	164.6
8	6.48 (1H,s)	100.7
8a	-	156.4
9	2.20 (3H,s)	20.1
10	6.70 (1H,s)	113.7
11	-	149.5
12	2.34 (1H,s)	22.7

5.1.2.2.2 Hasil identifikasi dengan metode spektrometri massa

Berdasarkan analisis spektrometri massa ESIMS menggunakan alat Micromass LCT spektrometer diperoleh spektra massa seperti pada lampiran 1.3. Dari data spektra ESIMS 2 tersebut menunjukkan adanya puncak ion molekul $m/z : 214 (M+H)^+$ dan berat molekul diperhitungkan sebagai $C_{13}H_{11}NO_2 (M+H)^+$ menggunakan HRESIMS ($m/z 214.0890 (M+H)^+$, $\Delta + 2.2 \text{ mmu}$).

5.1.2.2.3. Hasil identifikasi dengan menggunakan spektrofotometri FT-IR

Gambar spektrum IR (KBr) dari isolat 2 dengan menggunakan alat Jasco FTIR-230 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 1.4. Pada gambar spektrum inframerah tersebut dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat yang menunjukkan adanya OH dan/atau NH pada

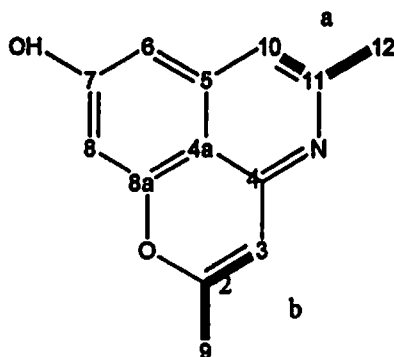
bilangan gelombang 3420 cm^{-1} serta gugus fungsional pada bilangan gelombang 1660 cm^{-1} dan 1620 cm^{-1} .

Hasil analisis terhadap isolat 2, dengan metode KLT menunjukkan bercak tunggal pada R_f : 0,45 dengan menggunakan fase gerak kloroform : etanol = 8 : 2. Identifikasi menggunakan penampak noda Dragendorff menunjukkan positif untuk golongan alkaloid dengan adanya warna jingga. Berdasar data spektrum inframerah dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat yang menunjukkan adanya OH dan/atau NH pada bilangan gelombang 3420 cm^{-1} serta gugus fungsional pada bilangan gelombang 1660 cm^{-1} dan 1620 cm^{-1} . Spektrum dari ^{13}C NMR menghasilkan 13 signal atom karbon yang terdiri dari tujuh karbon kuarterner, empat metin, dan dua metil. Di antara atom karbon tersebut terdapat lima karbon kuarterner (δ_c 149.5, 150.6, 156.4, 161.5 dan 164.6) yang berhubungan dengan atom nitrogen atau oksigen.

Dua bagian struktur lainnya yaitu a (dari C-10 ke C-12) dan b (dari C-9 ke C-2 dan C-3) disimpulkan dari analisis menggunakan ^1H - ^1H COSY dengan menggunakan fase gerak CDCl_3 - CD_3OD (1:1). Adanya substitusi cincin benzena dengan gugus hidroksil didapat dari data korelasi HMBC. Korelasi data HMBC untuk H-10 ke C-4a (δ_c 111.5) dan C-5 (δ_c 138.8) serta untuk H-3 ke C-4 (δ_c 150.6) dan C-4a menunjukkan adanya hubungan/konektivitas struktur a dan b melalui atom nitrogen dan C-4. Hubungan antara struktur a dan cincin benzena dapat diketahui dari korelasi NOESY antara H-6 dan H-10, begitu juga dengan adanya pertalian eter antara C-2 (δ_c 161.5) dan C-8a (δ_c 156.4) yang membentuk cincin pyran. Jadi isolat 2 disimpulkan sebagai sistem cincin trisiklik yang terdiri dari 3-metilisokuinolin-6-ol berpasangan dengan 2-metil-4H-cincin pyran pada C-4, C-4a dan C-8.

Hasil spektra ESI MS dari isolat 2 menunjukkan adanya puncak ion molekul m/z : 214 $(M+H)^+$ yang menunjukkan adanya atom N dan berat molekul diperhitungkan sebagai $C_{13}H_{11}NO_2(M+H)^+$ menggunakan HRESIMS (m/z 214.0890 $(M+H)^+$, $\Delta + 2.2$ mmu).

Berdasarkan kajian pustaka, maka dapat dikatakan bahwa data spektra dari isolat 2 ini sama dengan senyawa cassiarin A (Morita *et al.*, 2007) dengan struktur sebagai berikut:



5.2 Aktivitas Antimalaria Senyawa Cassiarin A Daun *C. siamea* Terhadap *P. falciparum*

Pada Masa Inkubasi 12, 24 dan 48 jam

Tabel 5.4 Persen penghambatan cassiarin A terhadap pertumbuhan *P. falciparum* dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam

Waktu (jam)	Bahan ($\mu\text{g/ml}$)	% parasitemia	% pertumb	% hambatan
0	Do	0,79	-	-
12	K-	1,45	0,66	0
	CA 0,1	1,05	0,26	60,60
	CA 10	0,95	0,16	75,76
24	K-	1,72	0,93	0
	CA 0,1	1,16	0,37	60,21
	CA 10	0,78	-0,01	100
48	K-	9,7	8,91	0
	CA 0,1	4,27	3,48	60,94
	CA 10	-	-	100

Keterangan:

Do = parasit pada jam ke 0

K- = kontrol negatif

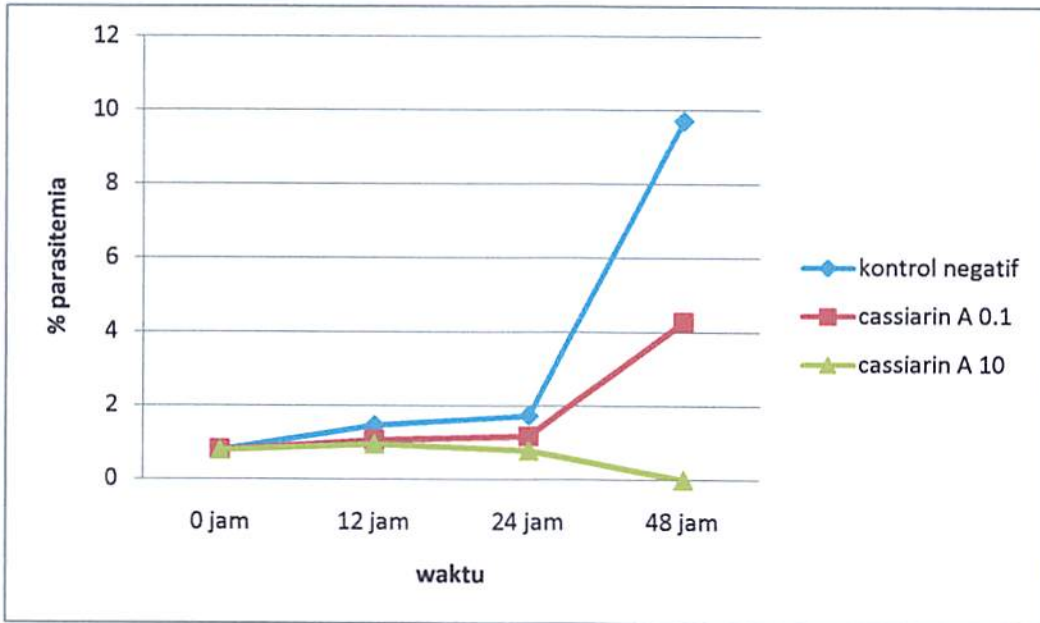
CA 0,1

CA 10

= cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$

= cassiarin A dosis 10 $\mu\text{g/ml}$

Tingkat parasitemia *P. falciparum* 3D7 yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dan dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ dari daun *C. siamea* pada 0, 12, 24 dan 48 jam, terlihat pada gambar 5.13 di bawah ini.

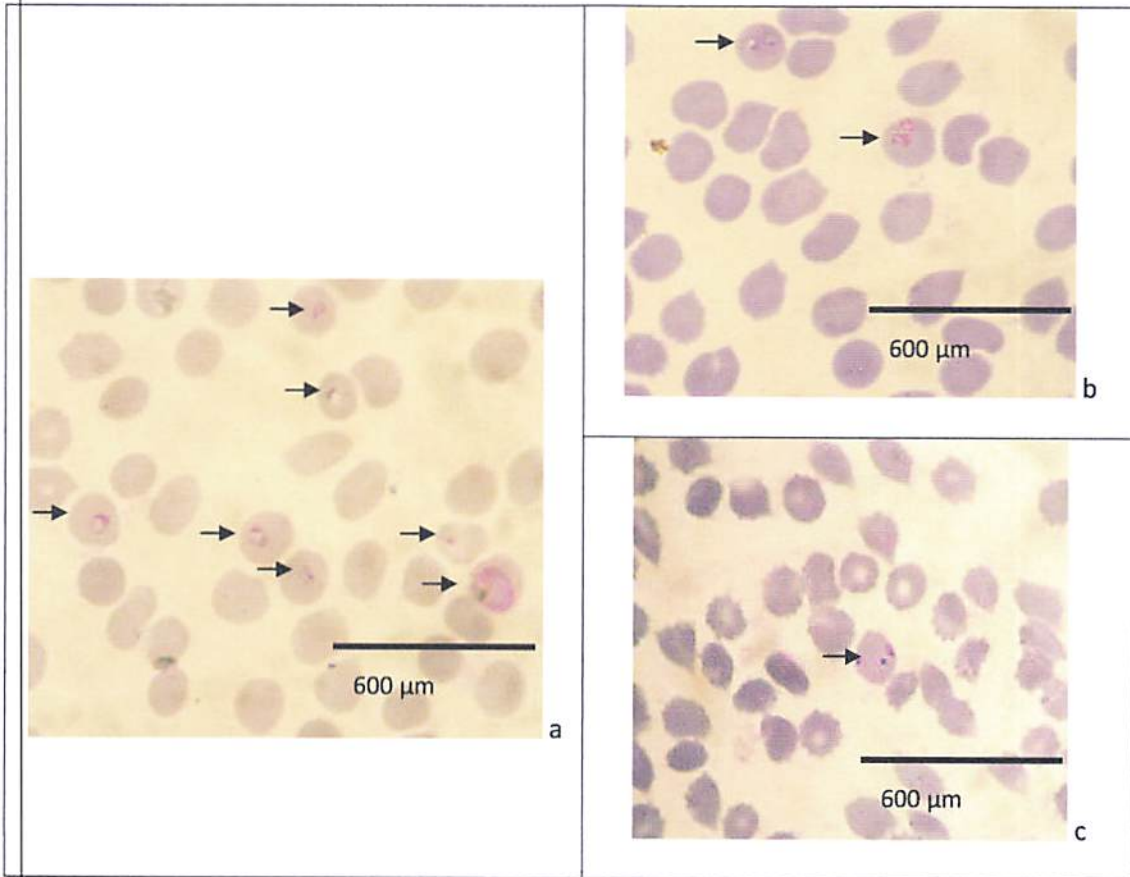


Gambar 5.5 Grafik tingkat parasitemia *P. falciparum* 3D7 yang diinkubasi senyawa aktif cassiarin A pada waktu pengamatan 0, 12, 24 dan 48 *in vitro*

Berdasarkan grafik di atas terlihat bahwa tingkat parasitemia pada kultur parasit yang tidak diberi senyawa aktif (kontrol negatif) terus meningkat pada sampai pada 48 jam. Sedangkan kultur parasit yang diberi senyawa aktif antimalaria menunjukkan penurunan persen parasitemia mulai pada jam ke-24 sampai pada pengamatan ke 48 jam. Dari grafik tersebut dapat dijelaskan juga bahwa biakan parasit yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A pada dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ menyebabkan parasit tumbuh dengan tingkat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan biakan parasit yang diinkubasi dengan dosis 0.1 $\mu\text{g/ml}$.

Gambaran penurunan parasitemia dengan menggunakan mikroskop cahaya dapat dilihat pada gambar 5.6 di bawah ini. Tanda panah memperlihatkan adanya parasit dalam sel darah merah.

Pada parasit yang diberi cassiarin A dosis 10 $\mu\text{g/ml}$, parasit hampir tidak ditemukan dan kalau pun ada hanya berupa titik kromatin tanpa sitoplasma yang menunjukkan parasit mati



Gambar 5.6 Gambaran penurunan parasitemia dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 1000x. Pada kontrol (a) adanya sejumlah parasit dalam sel darah merah dan (b) setelah diinkubasi 48 jam dengan cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ parasit jarang ditemukan sedang biakan dengan cassiarin A dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ (c) parasit mati. Panah hitam menunjukkan eritrosit yang terinfeksi oleh parasit

5.3 Hambatan Tiap Stadium Parasit Pada Pemberian Cassiarin A Pada Masa Inkubasi 12, 24 dan 48 jam

Tabel 5.5 Persen stadium parasit pada pemberian Cassiarin A dengan masa inkubasi 12, 24 dan 48 jam

Waktu (jam)	Bahan ($\mu\text{g/ml}$)	% stadium parasit dalam 1000 sel darah merah			% parasitemia
		Cincin	Trofozoit	Skizon	
0	Do	5,91	1,97	-	0,79
12	K-	4,27	9,4	0,86	1,45
	CA 0,1	6,13	3,5	0,88	1,05
	CA 10	7,14	2,38	-	0,95
24	K-	3,83	5,74	7,65	1,72
	CA 0,1	7,76	2,91	0,97	1,16
	CA 10	4,9	2,94	-	0,78
48	K-	87,13	9,9	-	9,7
	CA 0,1	31,82	9,09	1,82	4,27
	CA 10	-	-	-	-

Keterangan:

Do = parasit pada jam ke 0

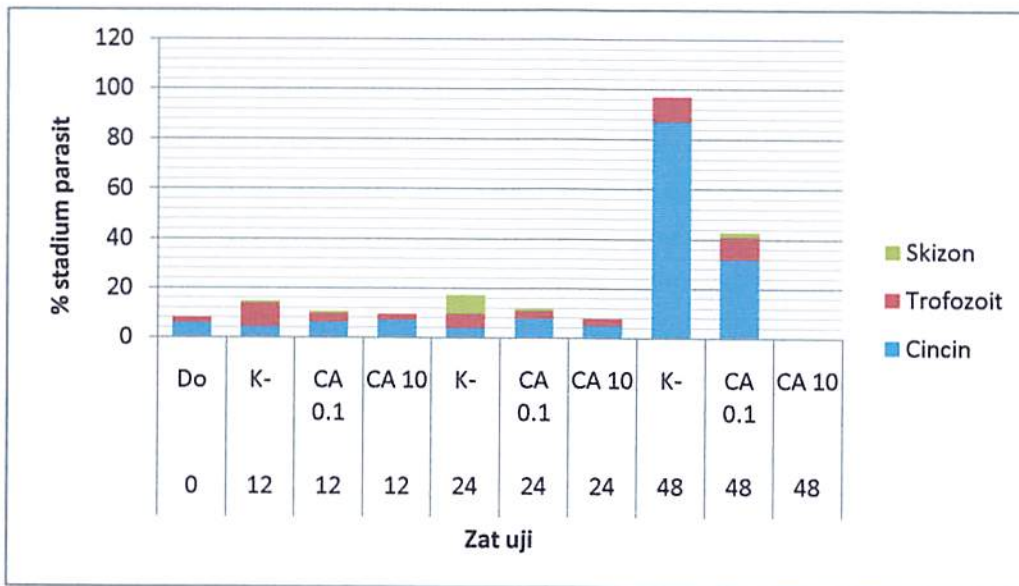
K- = kontrol negatif

CA 0,1

CA 10

= cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$

= cassiarin A dosis 10 $\mu\text{g/ml}$



Gambar 5.7 Grafik persen parasitemia berdasarkan stadium pertumbuhan *P. falciparum* 3D7 yang diberikan cassiarin A pada waktu pengamatan 0, 12, 24 dan 48 jam secara *in vitro*

Berdasarkan grafik di atas terlihat bahwa persen parasit malaria yang diinkubasi dengan senyawa aktif tumbuh dengan persentase stadium parasit yang berbeda dengan parasit tanpa pemberian senyawa aktif (kontrol negatif). Kultur normal tanpa pemberian senyawa aktif pada 0 jam, persentase stadium cincin lebih besar dibanding stadium trofozoit. Selanjutnya sampai pada inkubasi 12 jam, terjadi keadaan sebaliknya yang menunjukkan persentase stadium trofozoit lebih besar dari stadium cincin. Hal tersebut memberikan informasi bahwa parasit malaria stadium cincin pada 0 jam telah berkembang menjadi trofozoit. Namun hal berbeda terjadi kultur yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A. Pada masa inkubasi 12 jam persen parasitemia pada stadium cincin masih lebih banyak daripada stadium trofozoit. Hal ini mengindikasikan bahwa hanya sebagian stadium cincin dari 0 jam yang berubah menjadi trofozoit pada inkubasi 12 jam. Begitu juga pada masa inkubasi 24 jam, pada kontrol negatif persen parasitemia stadium skizon lebih banyak dibandingkan stadium lainnya. Sedangkan pada kultur yang diberi cassiarin A baik dosis $0,1 \mu\text{g/ml}$ maupun $10 \mu\text{g/ml}$, stadium cincin masih lebih besar dibandingkan bentuk stadium lainnya. Hal ini menandakan adanya hambatan dari stadium cincin untuk berkembang. Dan setelah diinkubasi selama 48 jam, pada kontrol negatif proporsi stadium cincin jauh lebih besar dibanding stadium lainnya, begitu pula pada kultur yang diberi cassiarin A dosis $0,1 \mu\text{g/ml}$ namun dengan persentasi yang sangat rendah dibandingkan kontrol negatif. Sedang pada kultur yang diberi cassiarin A dosis $10 \mu\text{g/ml}$, parasit hampir menghilang atau tidak ada pada semua stadium, walaupun ada hanyalah parasit yang mati.

Untuk hambatan tiap stadium, dapat dilihat pada pemberian senyawa cassiarin A dosis $0,1 \mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan kontrol negatif. Hambatan terbesar didapatkan pada stadium skizon dengan masa inkubasi selama 24 jam sebesar 87,3%. Sedangkan stadium trofozoit dihambat sebesar 79,41% pada masa inkubasi 12 jam dan hambatan pada stadium cincin sebesar 68,1%

setelah masa inkubasi selama 48 jam. Jadi dapat dilihat bahwa cassiarin A bekerja terutama pada stadium skizon. Hal ini seperti yang telah dilaporkan oleh Yayon *et al.* (1983), yang menyatakan bahwa stadium trofozoit dan skizon lebih sensitif terhadap klorokuin dibandingkan dengan stadium cincin.

Tabel.5.6. Persentase hambatan tiap stadium dari parasit setelah pemberian senyawa cassiarin A dosis 0.1 µg/ml dibandingkan dengan kontrol negative

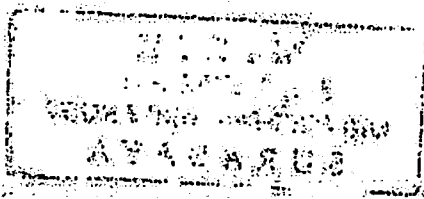
Waktu (jam)	Bahan (µg/ml)	% stadium parasit dalam 1000 sel darah merah		
		Cincin	Trofozoit	Skizon
0	Do	5,91	1,97	-
12	K-	4,27	9,4	0,86
	CA 0,1	6,13	3,5	0,88
	% hambatan	0	62,77	0
24	K-	3,83	5,74	7,65
	CA 0,1	7,76	2,91	0,97
	% hambatan	0	49,30	87,32
48	K-	87,13	9,90	-
	CA 0,1	31,82	9,09	1,82
	% hambatan	63,48	8,18	0

Keterangan:

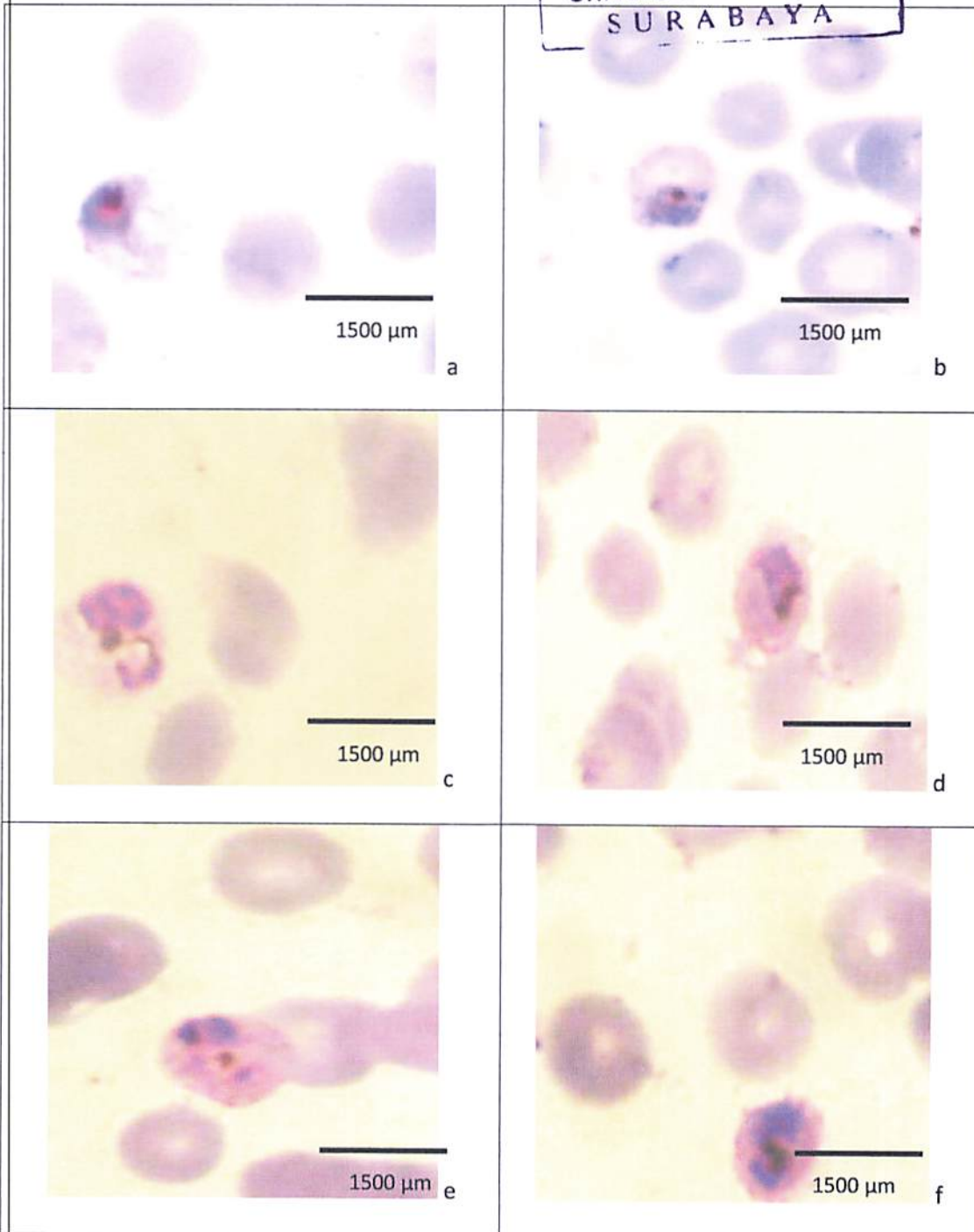
Do = parasit pada jam ke 0 CA 0,1 = cassiarin A dosis 0,1 µg/ml
 K- = kontrol negatif CA 10 = cassiarin A dosis 10 µg/ml

5.4 Efek Senyawa Cassiarin A terhadap Morfologi Parasit Malaria Menggunakan Mikroskop Cahaya

Efek patologis dari senyawa cassiarin A hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk yang telah terbukti aktif sebagai antimalaria secara *in vitro* dan *in vivo* selanjutnya dianalisis secara khusus pada morfologi parasit setelah diinkubasi *in vitro* selama 0, 12, 24 dan 48 jam dengan menggunakan mikroskop cahaya. Hasil pengamatan perubahan morfologi dari parasit setelah pemberian cassiarin A dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



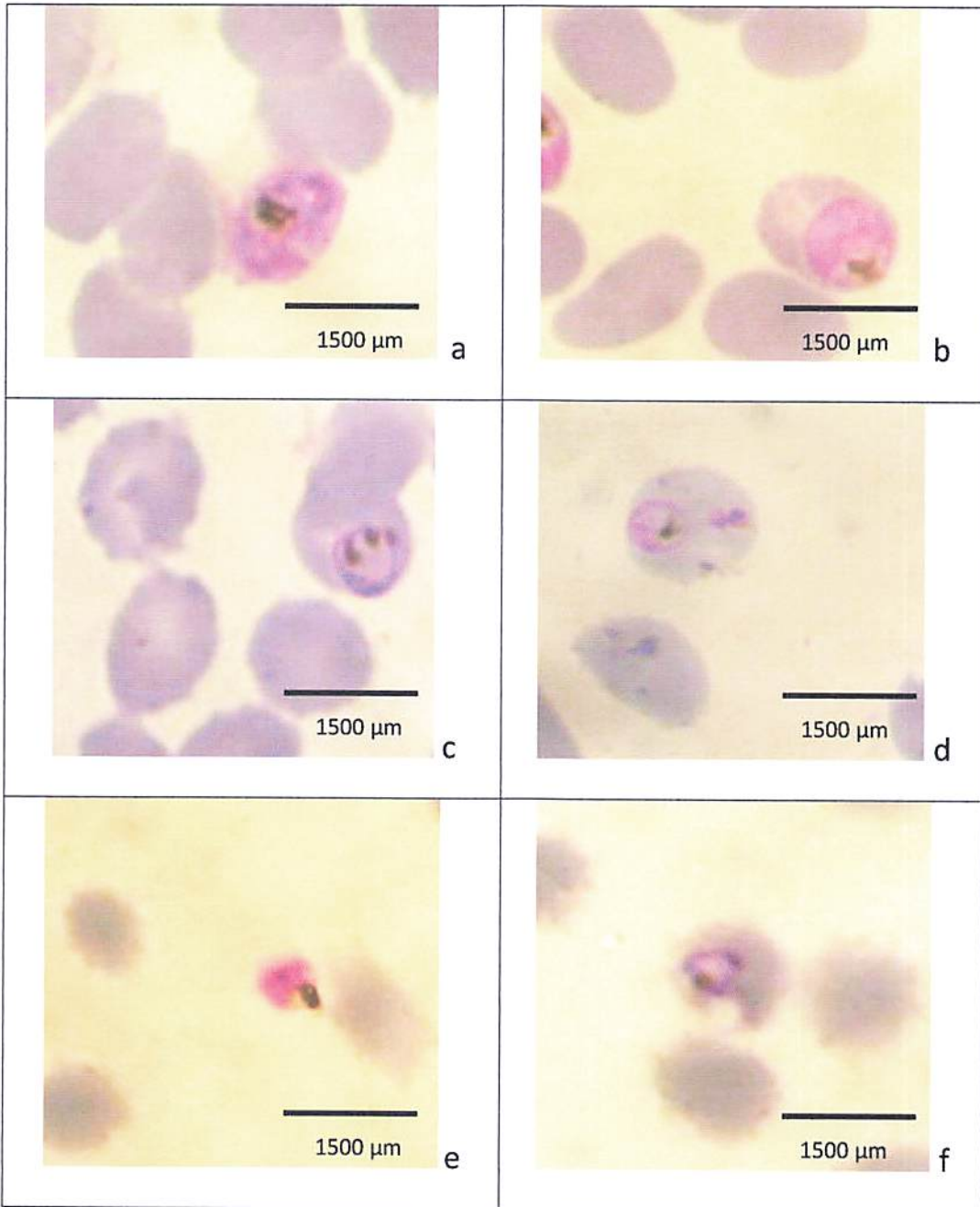
The main body of the document consists of several paragraphs of text. The text is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a formal letter or report, with a header section at the top, followed by several lines of text, and possibly a signature block at the bottom. The text is arranged in a standard left-aligned format.



Gambar 5.8 Morfologi *P. falciparum* 3D7 setelah diinkubasi selama 12 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 2500x. Pada kontrol (a-b) sitoplasma berbentuk ireguler berwarna biru dengan granula-granula berwarna merah jambu; dan pada biakan parasit yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A dosis 0,1 µg/ml (c-d) mulai terjadi degradasi parasit dengan inti kromatin berwarna lebih gelap (c) atau sitoplasma dengan inti kromatin tidak terlihat jelas dan vakuola berwarna gelap (d); pada dosis 10 µg/ml (e-f) degradasi parasit lebih terlihat jelas, inti kromatin terletak di tengah-tengah sitoplasma, berwarna lebih jernih (e) dan inti kromatin tidak berbentuk seperti titik (f)

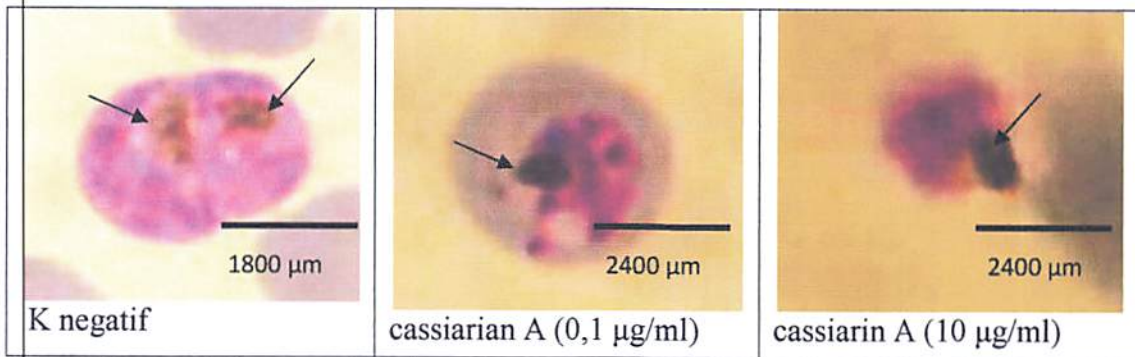
Pada pemeriksaan dengan mikroskop cahaya, parasit yang tidak diberi senyawa cassiarin A pada masa inkubasi 12 jam nampak biakan *P. falciparum* stadium cincin mulai mengalami penebalan sitoplasma menjadi stadium trofozoit awal. Terdapat nukleus berbentuk ireguler, granuler, terdiri dari kromatin berwarna merah berbentuk seperti filamen. Sitoplasma berbentuk ireguler berwarna biru dengan granula-granul berwarna merah jambu (gambar 5.8, a-b). Sedang pada kelompok parasit yang diberi senyawa cassiarin A, sampai dengan masa inkubasi 12 jam sudah mulai ditemukan adanya perubahan morfologi yang berbeda dengan kelompok kontrol. Pada parasit yang diberi cassiarin A dosis 0,1 µg/ml ditemukan adanya kelainan morfologi berupa inti kromatin yang berwarna lebih gelap (gambar 5.8, c) atau inti kromatin yang tidak terlihat jelas (gambar 5.8, d). Pada parasit yang diberi cassiarin A dosis 10 µg/ml, kelainan morfologi akibat terjadinya degradasi parasit tampak jelas dengan adanya inti kromatin yang terletak di tengah-tengah sitoplasma yang berwarna lebih jernih dibandingkan pada parasit normal (gambar 5.8, e) atau inti kromatin yang tidak berbentuk seperti titik.

Selanjutnya pada pengamatan 24 jam inkubasi, pada parasit kontrol dapat diamati perkembangan parasit menjadi bentuk trofozoit matur dengan pigmen berwarna kuning tengguli yang makin menonjol dan sitoplasma yang terlihat solid serta rapat (gambar 5.9, a-b). Pada parasit yang diberi bahan uji cassiarin A dosis 0,1 µg/ml terdapat kelainan morfologi berupa trofozoit dengan sitoplasma yang terlihat lebih jernih dan tipis dengan sedikit pigmen yang berwarna lebih gelap (gambar 5.9, c-d). Sedang parasit yang diberi bahan uji cassiarin A dosis 10 µg/ml kelainan berupa trofozoit yang terletak di luar eritrosit. Juga bentuk trofozoit dengan inti kecil tanpa pigmen yang berbentuk bulat berwarna hitam (gambar 5.9, e-f). Untuk dosis 10 µg/ml jelas terlihat hambatan perkembangan dari bentuk cincin menuju bentuk trofozoit.



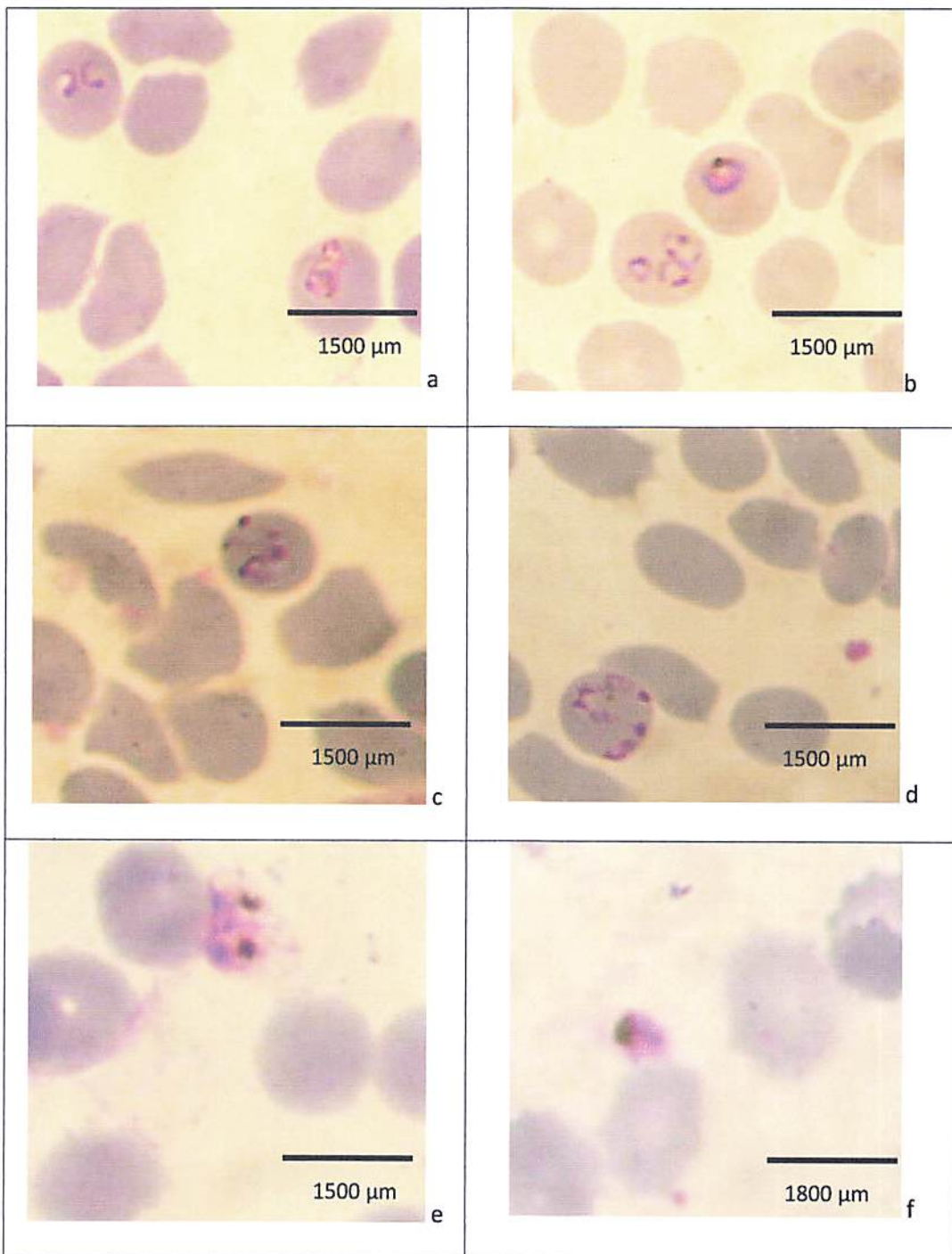
Gambar 5.9 Morfologi *P. falciparum* 3D7 setelah diinkubasi selama 24 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 2500x. Pada kontrol (a-b) trofozoit dengan pigmen berwarna kuning tengguli dan sitoplasma terlihat solid serta rapat; pada biakan parasit yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A dosis 0,1 µg/ml (c-d) trofozoit dengan sitoplasma terlihat lebih jernih dan tipis dengan sedikit pigmen berwarna lebih gelap; dan dosis 10 µg/ml (e) trofozoit terletak di luar eritrosit dan (f) parasit terdegradasi atau mati

Pada parasit yang diberi cassiarin A baik dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ maupun dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ hanya sedikit parasit yang mengandung hemozoin. Kalaupun ada parasit yang mengandung hemozoin maka letak maupun warna tidak seperti pada parasit normal. Berikut adalah gambaran perubahan morfologi hemozoin dari parasit kontrol yang berwarna kuning tengguli dibandingkan dengan parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dan dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ dengan hemozoin yang berwarna lebih kehitaman.



Gambar 5.10 Perubahan morfologi stadium trofozoit *P. falciparum* (strain 3D7) setelah masa inkubasi 24 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 4000x. Pada kontrol, hemozoin berwarna kuning tengguli dan pada parasit yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A, hemozoin berwarna lebih kehitaman dan parasit berada diluar sel darah merah

Pada pengamatan setelah 48 jam inkubasi, kelompok kontrol tanpa obat menunjukkan adanya bentukan stadium cincin kembali dengan warna biru dari sitoplasma dan titik inti kromatin berwarna merah gelap (gambar 5.11, a-b). Sedang pada kelompok parasit yang diberi bahan uji semuanya menunjukkan terjadinya degradasi dari parasit yaitu pada pemberian cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ walaupun menunjukkan adanya bentukan stadium cincin, namun banyak parasit dengan sitoplasma yang tidak berbentuk cincin dengan merozoit yang mati atau tidak berkembang menjadi bentuk cincin (gambar 5.11, c-d) dan untuk parasit yang diberi cassiarin dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ dapat diamati bahwa hampir tidak tampak adanya parasit kalaupun ada semua parasit berada di luar sel darah merah atau mati (gambar 5.11, e-f).



Gambar 5.11 Morfologi *P. falciparum* 3D7 setelah diinkubasi selama 48 jam menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 2500x. Pada kontrol (a-b) bentukan stadium cincin dengan warna biru dari sitoplasma dan titik inti kromatin berwarna merah gelap; dan pada biakan parasit yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A dosis 0,1 µg/ml (c-d) banyak parasit dengan sitoplasma tidak berbentuk cincin dengan merozoit yang mati atau tidak berkembang menjadi cincin; dan dosis 10 µg/ml (e-f) hampir semua parasit mati.

Efek pemberian cassiarin A terhadap perubahan morfologi *P. falciparum* setelah waktu diinkubasi 12- 48 jam, dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Bentuk dari sitoplasma yang menebal tetapi menunjukkan bentuk yang tidak bulat seperti trofozoit normal. Hal ini diduga karena adanya efek dari cassiarin A sehingga suplai nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan maturasi dari parasit menjadi terhambat.
2. Pemberian cassiarin A pada biakan parasit dapat menimbulkan lisis pada sel eritrosit sehingga letak trofozoit berada di luar sel eritrosit yang berarti parasit dalam keadaan mati. Perubahan morfologi seperti ini akan mempengaruhi proses pertumbuhan parasit. Kondisi *P. falciparum* yang berada di luar eritrosit seperti ini telah pula dilaporkan oleh Salmon *et al.* (2000). Pada kultur *P. falciparum* 3D7, W2 dan Dd2 *middle stage* skizon yang diinkubasi selama 8 jam dengan inhibitor protease yaitu E64 (L-transepoxy-succinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane), terlihat bahwa stadium skizon yang diinkubasi dengan E64 sebagai inhibitor protease, berkembang menjadi merozoit yang diselubungi membran intraselular dan berada di luar sel eritrosit. Hasil penelitian Salmon *et al.* (2000) ini memperkuat dugaan bahwa parasit yang berada di luar eritrosit dengan dilapisi membran intraselular merupakan salah satu perubahan morfologi parasit malaria karena adanya hambatan dari senyawa aktif antimalaria. Keadaan ini tentunya dapat mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan dari parasit sehingga dapat menyebabkan terjadinya kematian parasit.
3. Pemberian cassiarin A pada biakan parasit menimbulkan efek terhambatnya pembentukan hemozoin. Pada sedikit parasit yang terdapat hemozoin terjadi perubahan warna hemozoin menjadi hitam dan pecah (*aggregation*), yang dapat terlihat jelas pada

masa inkubasi 24 jam berbeda dengan hemozoin parasit normal tanpa pemberian senyawa aktif yang berwarna kuning tengguli.

4. Pemberian cassiarin A pada biakan parasit, menyebabkan terjadinya hambatan pada siklus hidup parasit. Biakan parasit malaria yang diinkubasi dengan cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pada masa inkubasi 12-24 jam, tetap berada pada stadium cincin dengan persentasi yang dominan dan tidak berkembang menjadi stadium trofozoit. Hal yang sama terjadi pada biakan parasit yang diberi cassiarin A dosis 10 $\mu\text{g/ml}$, bahkan pada dosis ini tidak pernah terjadi pembentukan stadium skizon. Pada masa inkubasi 24 jam parasit sudah banyak yang mati dan pada masa inkubasi 48 jam, hampir tidak ada parasit yang hidup, hanya ada bentukan parasit berupa titik hitam dan berada di luar sel

Berdasar hasil diketahui bahwa tingkat parasitemia dari parasit uji menurun seiring dengan perubahan dan kelainan morfologi dari parasit akibat pemberian cassiarin A pada masa inkubasi 12-48 jam. Hal diatas juga menunjukkan bahwa senyawa cassiarin A dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria terutama pada fase tropik (24 jam). Ini terbukti pada pemberian cassiarin A dosis 10 $\mu\text{g/ml}$ pada 12 jam setelah masa inkubasi, pertumbuhan parasit telah terhambat sebesar 75,76% dibandingkan parasit yang tidak diberi bahan uji. Dan setelah 24 jam masa inkubasi parasit telah terhambat 100% dibandingkan dengan kontrol.

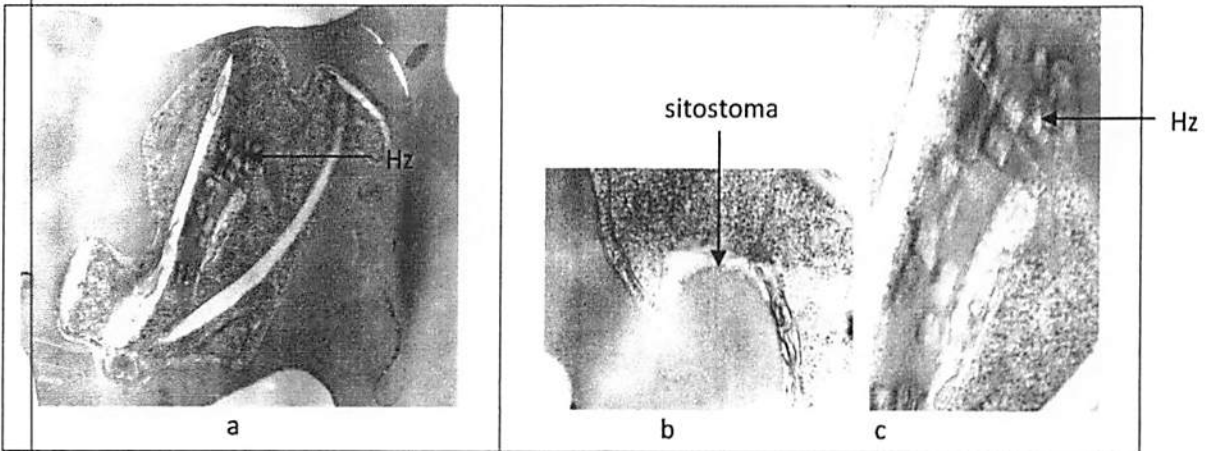
Hambatan senyawa cassiarin A pada pertumbuhan parasit yang ditunjukkan dengan perubahan-perubahan morfologi dari parasit terutama pada fase tropik 24 jam sangatlah potensial sebagai antimalaria. Hal ini dikarenakan pada fase tersebut parasit malaria mulai melakukan proses metabolisme yang aktif. Pada periode tropik, parasit mulai bertambah besar dari trofozoit awal menjadi trofozoit dewasa. Pengambilan sumber nutrisi dari sitosol eritrosit dikonsumsi dengan cepat di dalam vakuola makanannya yang mulai terbentuk. Proses degradasi hemoglobin

menjadi oligopeptida dan heme secara proteolisis di dalam vakuola makanan mulai berlangsung untuk memenuhi kebutuhan nutrisi parasit (Gamboa and Rosenthal 1996; Rosenthal *et al.*, 1991; Wisner, 2004).

Berdasar uraian di atas maka apabila terdapat senyawa aktif antimalaria yang menghambat pada periode ini, akan menyebabkan terjadinya gangguan metabolisme dari parasit sehingga mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan parasit, yang dapat teramati dari perubahan dan kelainan morfologinya.

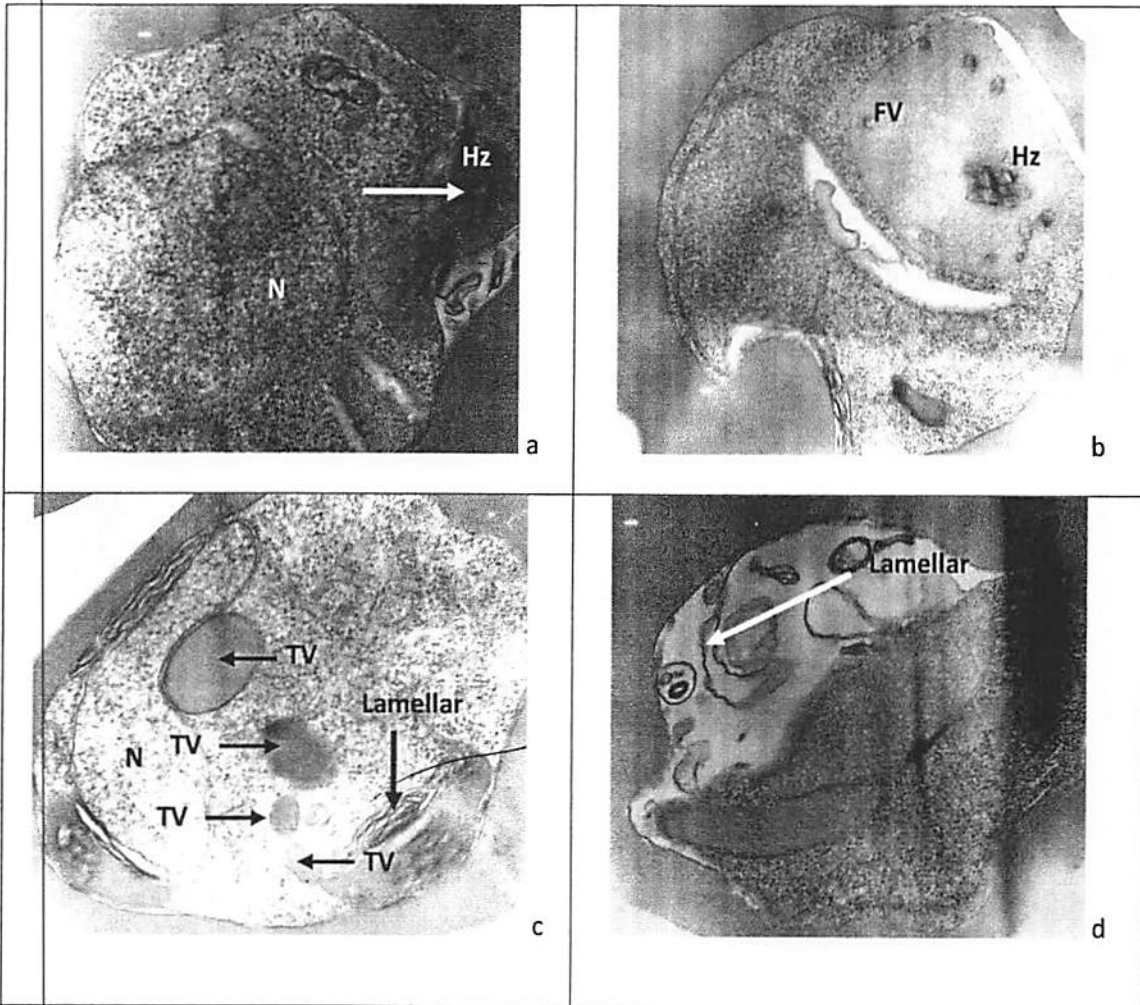
5.5. Analisis Ultrastruktur Parasit Malaria Menggunakan Mikroskop Elektron Transmisi

Pengamatan morfologi parasit malaria dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi menunjukkan bahwa pada parasit kontrol (Gambar 5.12, a), parasit dan eritrosit dibatasi (yang umumnya berhimpit dengan membran luar parasit) sehingga tidak kelihatan dengan jelas. Pada membran luar parasit, kadang dapat ditemukan suatu lekukan, yang disebut sebagai sitostoma (gambar 5.12, b), yang memiliki fungsi sebagai mulut untuk mengisap hemoglobin, melalui proses endositosis, yang melibatkan lisosome sekunder. Setelah proses endositosis selesai, hemoglobin yang telah diperoleh akan diangkut oleh lisosom sekunder ke vakuola makanan melalui proses fusi (penggabungan). Pada tahap selanjutnya, parasit akan mencerna hemoglobin dan menghasilkan suatu hasil antara berupa *heme*, yang oleh parasit akan dipolimerisasi menjadi bentuk hemozoin (gambar 5.12, c).



Gambar 5.12 Hasil ultra struktur parasit normal diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi. (a) Bentuk parasit dalam eritrosit; pada membran luar parasit (b) kadang ditemukan lekukan (sitostoma) Hz: hemozoin

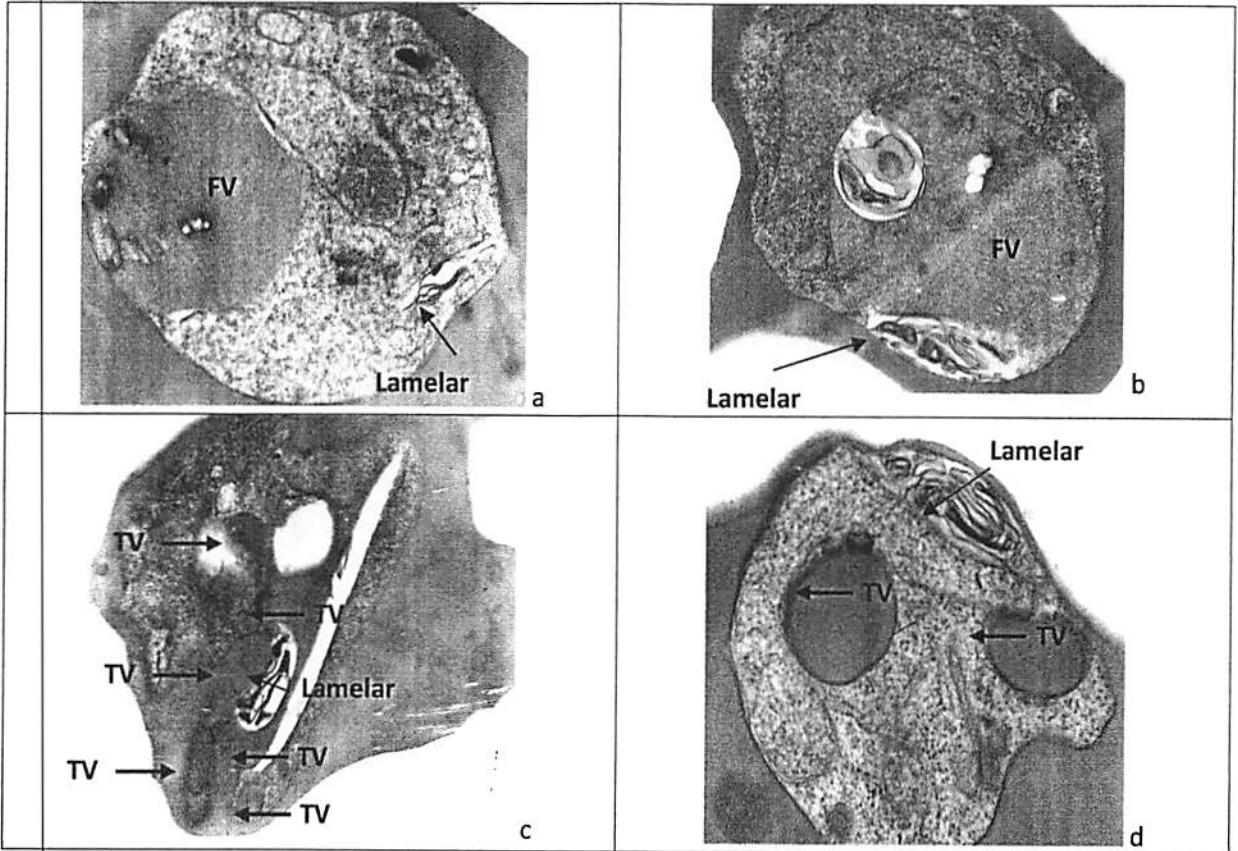
Pada pengamatan jam ke 12, setelah diinkubasi dengan cassiarin A dosis $0,1 \mu\text{g/ml}$ mulai ditemukan kelainan morfologi dibandingkan dengan parasit normal yaitu ditemukan sedikit hemozoin namun dengan struktur yang tidak beraturan (gambar 5.13, a-b), adanya pembengkakan dari vakuola makanan (gambar 5.13, b), ditemukan juga adanya peningkatan jumlah transport vesikel yang membawa hemoglobin (gambar 5.13, c), selain itu juga adanya bentukan lamellar (gambar 5.13, c-d).



Gambar 5.13 Hasil ultra struktur parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dengan masa inkubasi 12 jam diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi. Pada (a) ditemukan sedikit hemozoin namun dengan struktur tidak beraturan, (b) pembengkakan vakuola makanan, (c) peningkatan jumlah transport vesikel dan (d) ada bentukan lamellar, Hz: Hemozoin, FV: Food Vacuole, TV: transport vesikel dan N: inti

Sedang pengamatan pada jam ke 24 parasit yang diinkubasi dengan senyawa cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mengalami kelainan morfologi yang hampir sama namun tampak lebih jelas dibandingkan kelainan parasit dengan masa inkubasi 12 jam, pada umumnya tidak ditemukan struktur hemozoin kalau pun ada hanya sedikit dengan struktur yang tidak beraturan (gambar 5.14, a-b), adanya pembengkakan dari vakuola makanan (gambar 5.14, a-b), ditemukan juga

lebih banyak parasit dengan peningkatan jumlah transport vesikel yang membawa hemoglobin (gambar 5.14, c-d), selain itu juga hampir semua parasit menunjukkan adanya bentukan lamellar (gambar 5.14, a-d).



Gambar 5.14 Hasil ultra struktur parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dengan masa inkubasi 24 jam diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi. Pada (a-b) terjadi pembengkakan vakuola makanan dan adanya sedikit hemozoin, (c-d) peningkatan jumlah transport vesikel dan (a-d) hampir semua parasit menunjukkan adanya bentukan lamellar, FV: *Food Vacuole* dan TV: transport vesikel

Efek patologis dari senyawa cassiarin A pada *P. falciparum* menunjukkan bahwa pada sedikit parasit yang masih ada pada kultur yang telah diberi cassiarin A dengan masa inkubasi 12 jam masih terlihat adanya sedikit kristal hemozoin namun dengan struktur yang tidak beraturan. Sedang pada kultur dengan masa inkubasi 24 jam, hampir tidak terdapat adanya kristal hemozoin

pada vakuola makanan semua parasit. Hal sebaliknya terjadi pada kultur kontrol tanpa bahan uji, dimana pada semua vakuola makanan parasit terdapat bentukan kristal hemozoin dengan struktur teratur seperti anyaman. Tidak adanya kristal hemozoin pada kultur parasit akan dapat menyebabkan kematian pada parasit karena heme yang tidak mengalami polimerisasi menjadi hemozoin akan bersifat toksik terhadap parasit itu sendiri. Hal ini juga sesuai dengan persen penghambatan pada 12 jam hanya sebesar 75,76% menjadi 100% pada masa inkubasi 24 jam.

Perubahan morfologi lainnya yang dapat dilihat diantaranya adanya pembengkakan dari vakuola makanan. Pada parasit kontrol tanpa bahan uji, vakuola makanan tidak membengkak dan banyak berisi kristal hemozoin. Sebaliknya pada kultur parasit yang diberi bahan uji, baik pada pemberian cassiarin A dosis 0,1 µg/ml dengan masa inkubasi 12 jam maupun dengan masa inkubasi 24 jam, keduanya dapat diamati adanya pembengkakan dari vakuola makanan. Pembengkakan vakuola makanan ini disebabkan hemoglobin tidak terdegradasi dan terakumulasi di dalam vakuola makanan parasit malaria. Pembengkakan vakuola makanan parasit malaria, merupakan salah satu ciri terhambatnya proses hidrolisis hemoglobin di dalam vakuola makanan. Perubahan morfologi parasit malaria dengan membengkaknya vakuola makanan, juga telah dilaporkan pada beberapa penelitian yang mana disebabkan pengaruh dari E64 sebagai inhibitor protease (Gamboa and Rosenthal, 1996; Rosenthal, 2001; Sijwali *et al.*, 2004) dan benzyloxycarbonyl (Z)-Phe-Arg-CH₂F terhadap *P. falciparum* (Rosenthal, 2001; Sijwali *et al.*, 2004).

Adanya bentukan lamellar pada kultur yang diberi bahan uji cassiarin A juga merupakan kelainan morfologi yang dapat diamati dengan mikroskop elektron transmisi. Pada parasit kontrol tanpa bahan uji, tidak nampak adanya bentukan lamellar, sedang pada kultur dengan cassiarin A dosis 0,1 µg/ml baik dengan masa inkubasi 12 jam maupun 24 jam terdapat bentukan

tersebut. Namun bentuk ini lebih banyak terdapat pada kultur dengan pemberian cassiarin A dengan masa inkubasi 24 jam. Hal ini juga dilaporkan oleh Maeno *et al.* (1993) yang meneliti efek artemisinin pada perubahan morfologi *P. falciparum*. Lamellar ini diduga berasal dari membran plasma yang berarti telah terjadi kerusakan pada membran yang selanjutnya bisa menimbulkan kematian pada parasit.

Konfirmasi ultrastruktur lain juga didapat untuk mengetahui efek cassiarin A pada jalur penghambatan *uptake* hemoglobin. Pada parasit normal jumlah transport vesikel yang berisi hemoglobin sangat sedikit dibandingkan dengan kultur yang diberi bahan uji. Pada gambar 5.20, c dapat dilihat jumlah transport vesikel pada parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 µg/ml dengan masa inkubasi 24 jam jauh lebih banyak. Hal ini diduga pada parasit normal hemoglobin yang didapat langsung didegradasi dalam vakuola makanan, sedang pada parasit dengan bahan uji mengalami hambatan pada proses pemasukan hemoglobin pada vakuola makanan sehingga masih banyak transport vesikel yang berisi hemoglobin yang terdapat diluar vakuola makanan parasit. Fenomena ini juga telah dilaporkan oleh Hong-Chang *et al.* (2009) yang mengamati efek dari dynamin pada jalur penghambatan *uptake* hemoglobin. Begitu pula yang dilaporkan oleh Hope *et al.* (2004), yang menyatakan adanya akumulasi dari transport vesikel dalam sitosol parasit, yang mungkin dikarenakan adanya hambatan dari penggabungan vesikel-vakuola.

5.6 Efek Senyawa Cassiarin A hasil isolasi daun *C. stamea* pada proses endositosis parasit malaria

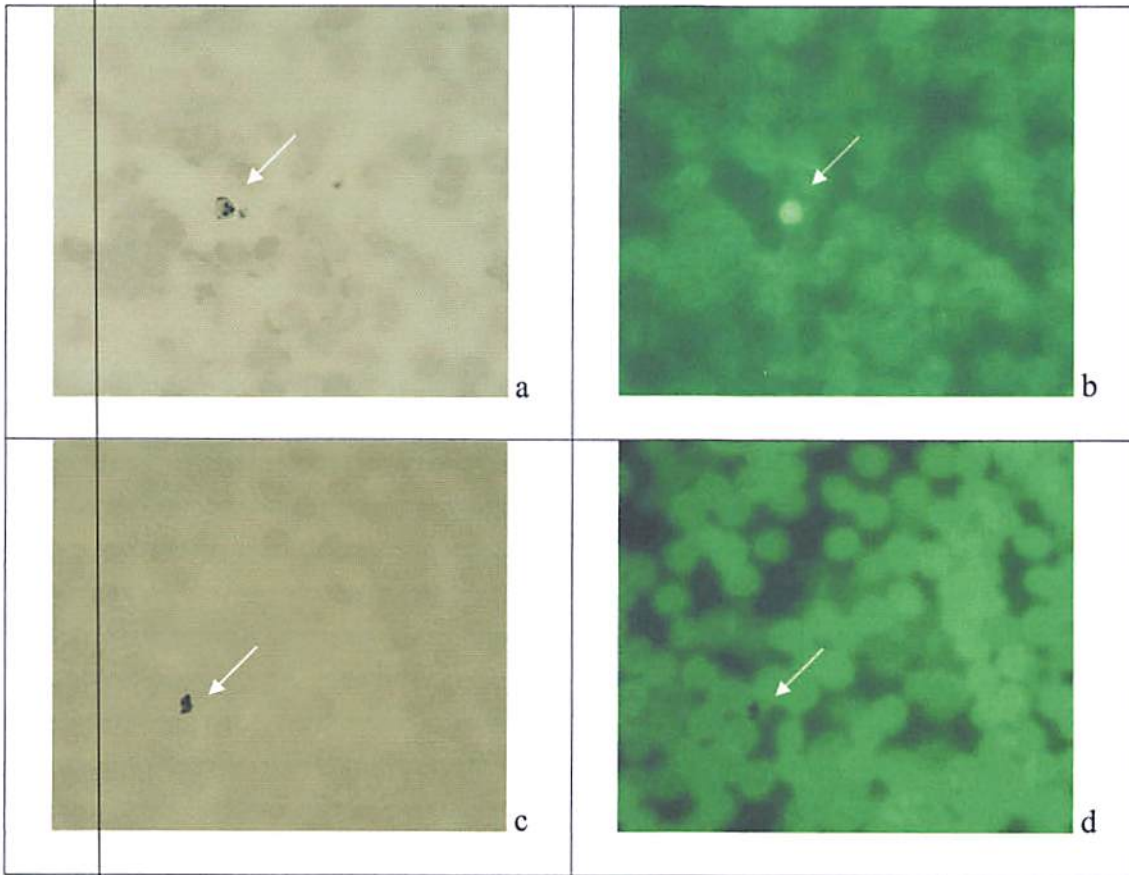
Hasil uji penghambatan endositosis dengan memakai FITC-Dextran dapat dilihat pada tabel dan gambar di bawah ini. Pengamatan dilakukan dengan melihat parasit baik pada mikroskop cahaya maupun dengan mikroskop fluoresensi. Apabila ada hambatan endositosis, maka walau parasit nampak dengan menggunakan mikroskop cahaya, parasit tidak berfluoresensi karena adanya

hambatan pengambilan hemoglobin yang mengandung FITC-Dextran sehingga tidak nampak dengan mikroskop fluoresensi. Sebaliknya apabila tidak ada hambatan pada proses endositosis, maka parasit akan nampak baik pada mikroskop cahaya maupun dengan mikroskop fluoresensi karena parasit dapat berfluoresensi sebagai hasil terjadinya pengambilan hemoglobin yang mengandung FITC-Dextran.

Tabel 5.7 Hasil uji hambatan pada proses endositosis dari senyawa cassiarin A dosis 0,1 µg/ml terhadap *P. falciparum* 3D7

Bahan Uji	Rep	% Endositosis	% Penghambatan endositosis	Rata-rata % pengham endo
Kontrol negatif	1	92,0	0	0
	2	88,0	0	
Cassiarin A	1	26,0	71,74	72,23 ± 0,69
	2	24,0	72,72	
Klorokuin difosfat	1	44,0	52,17	53,36 ± 1,68
	2	40,0	54,54	

Berikut ini adalah gambar hasil penghambatan proses endositosis dari parasit yang diamati dengan mikroskop cahaya dan mikroskop fluoresensi.



Gambar 5.15 Penghambatan proses endositosis pada parasit *P. falciparum* 3D7. Pada pengamatan parasit yang tidak diberi bahan uji dengan mikroskop cahaya (a) akan memberikan fluoresensi (b). Sedang parasit yang diberi cassiarin A dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (c) tidak memberikan fluoresensi (d) sebagai akibat adanya penghambatan pada proses endositosis

Pada spesies *Plasmodium* secara umum diketahui proses endositosis untuk mendapatkan hemoglobin dari sitoplasma terjadi melalui sitostoma, yaitu suatu bentukan khusus yang terdiri dari invaginasi membran plasma parasit dan membran parasitophorus vakuola. Apabila ada hambatan pada proses endositosis sebagai bagian proses pengambilan hemoglobin maka hal ini bisa mempengaruhi pertumbuhan parasit.

Berdasarkan data pengujian yang didapat, diketahui parasit yang diberi cassiarin A dosis 0,1/ml menghambat proses endositosis sebesar 72,50% dibandingkan dengan kontrol negatif,

sedang klorokuin difosfat sebagai obat malaria standard menghambat proses endositosis sebesar 55,56%. Hope *et al.* (2004) telah meneliti pula hambatan proses endositosis dari klorokuin menggunakan biotin-dextran dan diperoleh hasil sebesar 44%. Disini dapat dilihat bahwa potensi cassiarin A dalam menghambat proses endositosis lebih besar daripada klorokuin difosfat. Hambatan pada proses endositosis ini terkonfirmasi dengan pengamatan ultrastruktur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan cassiarin A dosis 0,1 µg/ml pada waktu pengamatan 12 dan 24 jam. Pada parasit normal jumlah transport vesikel yang berisi hemoglobin sangat sedikit dibandingkan dengan kultur yang diberi bahan uji, dan jumlah transport vesikel pada parasit yang telah diberi cassiarin A dosis 0,1 µg/ml dengan masa inkubasi 24 jam jauh lebih banyak. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Hong-Chang (2009) yang menyatakan bahwa pada parasit normal yang diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi, jumlah transport vesikel hanya sekitar 1,5 per parasit, sedang jumlah transport vesikel dari parasit yang telah diberi bahan uji (dynasore) yang terbukti menghambat proses endositosis meningkat sekitar 7,5 per parasit. Dari sini juga dapat disimpulkan pula bahwa hambatan endositosis dari senyawa cassiarin A terjadi pada vakuola makanan

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Cassiarin A menghambat pertumbuhan *P. falciparum* terutama pada fase tropik (24 jam)
2. Hambatan terbesar dari Cassiarin A didapatkan pada stadium skizon
3. Pengamatan dengan mikroskop cahaya menunjukkan adanya kelainan morfologi berupa degradasi parasit pada masa inkubasi 12-48 jam.
4. Pengamatan secara ultra struktural membuktikan bahwa cassiarin A bekerja pada penghambatan proses endositosis dengan meningkatnya jumlah transport vesikel, degradasi hemoglobin dengan adanya pembengkakan vakuola makanan dan detoksifikasi heme dengan sedikit/tidak adanya kristal hemozoin.
5. Penghambatan proses endositosis dari cassiarin A lebih besar daripada klorokuin difosfat sebagai obat antimalaria standard dari golongan alkaloid sehingga sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria baru

5.2. Saran

Senyawa Cassiarin A dari *daun C. siamea* sangat potensial untuk dijadikan obat malaria dan dapat dikembangkan sebagai senyawa penanda (marker) bagi keperluan pengembangan produk fitofarmaka.

DAFTAR PUSTAKA

- Aikawa M, 1971. Parasitological review. *Plasmodium*: The fine structure of malaria parasites. **Experimental Parasitol** 30: 284-320.
- Attaran A, 2004. "Where did it all go wrong? *Nature* 430: 932-3.
- Backer CA and Backhuizen, 1963. *Flora of Java*. Spermatophyta only. Walters Noordhoff N.V. Groningen, Nederlandands, pp. 539 – 540.
- 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.
- Bozzola JJ and Russell LD, 1999. **Electron Microscopy principles and techniques for biologists**, 2nd, Jones and Barlet Publisher Sudbury Massachusetts. pp 1-261.
- Burke E, Deasy J, Hasson R, McCormack R, Randhawa V, Walsh P, 2003. Antimalarial drug from nature, **J Trinity Student Med.**
- Bycroft BW, Hassaniali-Walji A, Johnson AW and King TJ. 1970. The structure and synthesis of baracol: a novel dioxaphenalena derivative from *Cassia siamea*. **J. Chem. Soc. (C)** 1668-1689.
- Depkes RI, 1987. **Analisis obat tradisional**. Jilid I, Jakarta: 43-52.
- Depkes RI, 1989. *Cassia siamea* folium, **Materia Medika Indonesia**. Jilid V, Jakarta, hal 129-133.
- Depkes RI, 2004. **Penggunaan artemisinin untuk atasi malaria di daerah yang resisten klorokuin**. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Depkes RI, 2007. **Keputusan Menteri Kesehatan tentang Pedoman Penyelenggaraan Sistem Kewaspadaan Dini Penyakit Malaria dan Penanggulangan Kejadian Luar Biasa**. Jakarta
- Egan TJ, Ross D and Adams PA. 1994. Quinoline antimalarial drugs inhibit spontaneous formation of β -hematin (malaria pigment). **FEBS Letters** 352 (1994) 54-57.
- Egan TJ, Ross DC, Adams PA, 1996. The mechanism of action of quinolines and related antimalarial drugs. **South Afr Sci J** 92: 11-14.
- Egan TJ, Hunter R, Kashula CH, Marques HM, Misplon A, Walden J, 2000. Structure-fuction relationships in aminoquinoline: effect of amino and cloro groups on quinoline-hematin complex formation. Inhibition of β -hematin formation and antiplasmodial activity. **J Med Chem** 43: 283-291.
- Ekasari W, Wahjo D, Yoes PD, 2001. Uji antimalaria *in vitro* dari ekstrak etanol, kloroform daun *C. siamea*. **Majalah Kedokteran Tropis Indonesia**. Vol. 12 No. 12 September 2001.
- Ekasari W, Wahjo D, Yoes PD, and Suhintam P, 2001. *In vitro* antiplasmodial activity of alkaloid fraction of chloroform extract of *Cassia siamea* leaves. WHO UI, Jakarta.
- Ekasari W, Aty W, Suhintam P, 2002. Daya skinzontosida ekstrak etanol, ekstrak kloroform dan fraksi yang positif alkaloid daun *C. siamea* pada biakan *in vitro* *P. falciparum*. Penelitian BBI. Lemlit Unair. Surabaya.
- Ekasari W dan Widyawaruyanti A, 2003. Uji antimalaria ekstrak etanol daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*, Lemlit Unair. Surabaya.

- Ekasari W, Aty W, Suhintam P, 2004. Uji antimalaria senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* pada biakan in vitro *P. falciparum*. Penelitian Dosen Muda /BBI. Lemlit Unair Surabaya.
- Ekasari W, Widyawaruyanti A, Tantular I, 2005. Uji antimalaria hasil fraksinasi ekstrak kloroform daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*. Penelitian Dosen Muda /BBI. Lemlit Unair Surabaya.
- Ekasari W, Zaini NC, Santosa MH, Hafid F, Widyawaruyanti A, 2005. Pengembangan daun johar (*Cassia siamea*) sebagai fitofarmaka antimalaria. Penelitian BPOM. Tahun ke-I.
- Ekasari W, Zaini NC, Santosa MH, Hafid F, Widyawaruyanti A, Dachlan YP, Setyawan D, Studiawan H, Khatib J, 2006. Pengembangan daun johar (*Cassia siamea*) sebagai fitofarmaka antimalaria. Penelitian BPOM. Tahun ke-II.
- Ekasari W, Widyawaruyanti A, Tantular I, 2006. Uji Antimalaria Ekstrak Air (Infusa dan Seduhan) daun *C. siamea* pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. Penelitian DIPA. Lemlit Unair Surabaya.
- Ekasari W, Widyawaruyanti W, Zaini NC, Syafruddin, Honda T, and Morita H, 2009. Antimalarial activity of cassiarin a from the leaves of *Cassia siamea*. *Heterocycles*. Vol.78 No.7 pp. 1831-1836.
- El-Sayyad SM, Ross SA and Sayed HM, 1984. New isoquinolone alkaloids from the leaves of *Cassia siamea*. *J. of Natural Products*. Vol. 47 (4): 708 – 710.
- Fahmi Ismail dan Khairunnisa Sri, 2009. Kewaspadaan terhadap malaria. Dinas Kesehatan Kabupaten Tapanuli Selatan.
- Farnsworth NR and Bunyapraphatsara N, 1992. **Thai medicinal plants: a recommende for primary health care system**. Bangkok: Medicinal Plant Information Center; 102-6
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S, 2004. Antimalarial drug discovery : Efficacy models for compound screening, *Review, Nature* 3 (Juni): 509-520.
- Gamboa DND and Rosenthal PJ, 1996. Cysteine protease inhibitor block early steps in hemoglobin degradation by culture malaria parasite, *Blood* 87(10): 4448-4454.
- Gandahusada S, Pribadi W, Ilahude HD, 1990. **Parasitologi Kedokteran**, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 125-155.
- Gbeassor et al, 1989. Antimalarial effect of eight african medicinal plants. *J. Ethnopharmacology* 25 (1): 115–118.
- Hadi, 1997. Pengaruh ekstrak heksan, kloroform dan metanol kulit batang *Cassia siamea* Lamk terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum* in vitro. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Hallock YF, Manfredi KP, Blunt JW, Cardellina JH, II Schaffer M, Gulden KP, Bringmann G, Lee AY, Clardy J, Francois G, Boyd M R, 1994. Korupensamines A-D novel antimalarial alkaloids from *Ancistrocladus korupensis*. *J. Org. Chem.* 59: 6349-6355.
- Harijanto PN, 2000. **Malaria: epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis dan penanganan**, Ed 1, Jakarta: EGC.
- Heyne K, 1987. **Tumbuhan berguna indonesia**. Jilid 3, Terjemahan Badan Litbang Kehutanan, Jakarta: hal. 926–927.
- Hong-Chang Z, Yu-hui G, Xiang Z and Heng W, 2009. Dynamin Like protein 1 participated in the hemoglobin uptake pathway of *Plasmodium falciparum*. *Chin Med J*; 122 (14): 1686-1691.

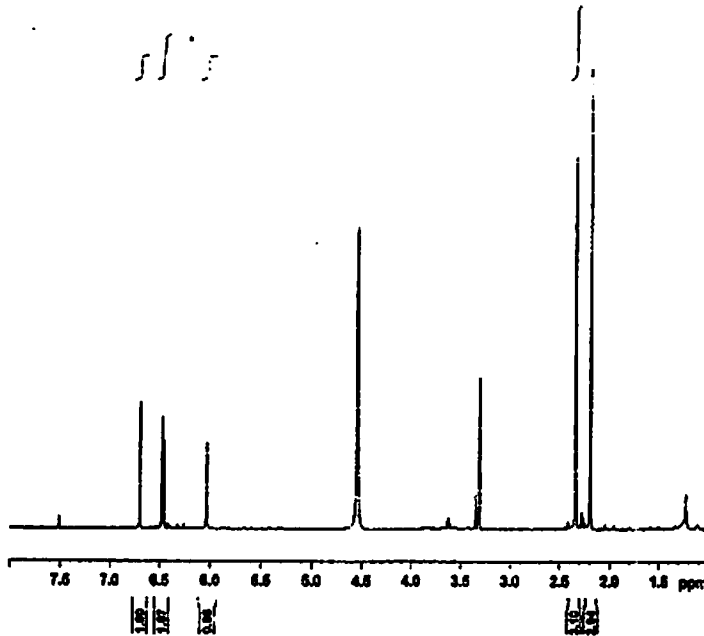
- Hoppe HC, Schalkwyk DA, Wiehart UJM, Meredith SA, Egan J, Weber BW, 2004. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *P. falciparum*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (7): 2370-2378.
- Iwasa K, Moriyasu M, Tachibana Y, Kim H, Wataya Y, Wiegerebe W, Bastow KF, Cosentino LM, Kozuka M and Lee K, 2001. Simple Isoquinoline and Benzylisoquinoline Alkaloids as Potential Antimicrobial, Antimalarial, Cytotoxic, and Anti-HIV Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Vol. 9, issue 11: 28721-2884
- Maeno Y, Toyoshima T, Fujioka H, Ito Y, Meshnick SR, Benakis A, Milhous WK, Aikawa M. 1993. Morphological effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49 (4). Pp 485 - 491
- Morita H, Oshimi S, Hirasawa Y, Koyama K, Honda T, Ekasari W, Indrayanto G and Zaini NC, 2007. Cassiarin and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters* Vol 9. No. 18. 3691-3693.
- Padumanonda T, 2006. Determination of baracol and anthraquinone contents and hepatotoxicity evaluation of *Senna siamea* extracts. *Dissertation, Mahidol University.*
- Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL and Chauhan VS, 1999. Artemisinin, an endoperoxide antimalaria, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malaria parasite. *J Biol Chem* 274 (27): 1983-1988.
- Pandey AV, Bisht Himani, Babbarwal VK, Srivastava J, Pandey KC and Chauhan VS. 2001. Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem.J.* 333-338.
- Perez E, Saez J, Blair S, Franck X and Figadere B, 2004. Isoquinoline alkaloid from *Duguetia vallicola* stem bark with antiplasmodial activity. *Letters in Organic Chemistry* (1) 102-104.
- Phillipson JD and Wright CW, 1991. Antiprotozoal agents plant sources. *Planta Medica* 57 (1) : 53 - 59
- Purwanto E, 1997. Pengaruh fraksi heksan, kloroform dan methanol daun *C. siamea* Lamk. terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*. Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Roberts L, Egan TJ, Joiner KA, Hoppe HC, 2008. Differential effects of quinoline anti-malarials on endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 1478.
- Rosenthal PJ, Wollish WS, Palmer JT, Rasnick D, 1991. Antimalarial effects of peptide inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cystein protease. *J Clin Invest* 88: 1467-1472.
- 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.
- Sherman IW, 1998. *Malaria, parasite biology, pathogenesis and protection*. Washington D.C: ASM press.
- Silverstein RM and Webster FX, 1998. *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley and Sons Inc, pp 87.
- Sjafruddin D, Siregar JE, Asih PBS, 2004. Antimalarial drug resistance in Indonesia: A molecular analysis. Symposium of malaria control in Indonesia, *Proceeding*. TDC Airlangga University, Surabaya.
- Steele JCP et al, 1999. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Medica* 65 (5): 413-416

- Sub Direktorat Malaria, 2004. **Kejadian Luar Biasa (KLB) malaria di Indonesia 1991-2003.** Direktorat Jenderal Pencegahan Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan Pemukiman. Jakarta.
- Sullivan Jr, Dj, 2001. **Hemozoin: biocrystal synthesized during the degradation of hemoglobin.** Reviu, Departement of molecular microbiology and immunology, Bloomberg Scholl of Public Health, John Hopkins University, pp 129-136.
- Sutisna P, 2004. **Malaria secara ringkas: dari pengetahuan dasar sampai terapan, Ed 1,** Jakarta : Kedokteran EGC.
- Tarigan J, 2003. **Kombinasi Kina Tetrasiklin pada Pengobatan Malaria Falciparum tanpa Komplikasi di Daerah Resisten Multidrug Malaria.** USU Digital Library.
- Trager W and Jensen JB, 1976. Human malaria parasites in continous culture *Science*. 193. pp. '673-675
- Tripathi AK and Gupta KR, 1991. Phytochemical study of *Cassia siamea*. *J. Indian Chem Soc.* 68 (4), 254-5.
- Varshney IP, Pal R. 1977. Chemical investigation of *Cassia siamea* flowers and bark. *J. Indian Chem Soc.* 54 pp. 548.
- Wickham ME, Culvenor JG and Cowman AF, 2003. Selective inhibition of a two step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* 278 (39): 37658-37663.
- Wiser MF, 2001. Biochemistry of plasmodium. Reviu, Tulane University, http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref_msp (Juni 2005).
- Wiser MF, 2003. Mechanism of drug action and resistance (Focus on malarials) <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/summary.html#na> (2 Agustus 2008).
- Wiser MF, 2004. Cellular and molecular biology of *Plasmodium*. Reviu, Tulane University, <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref-msp>, (2 Agustus 2008).
- World Health Organization, 4-5 April 2001. **Antimalarial Drug Combination Therapy: Report of a WHO Consultation,** Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, 19 Mei 2003. **WHO report meeting on antimalarial drug development.** Manila. <http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai>.
- World Health Organization, 2007. **Malaria situation in SEAR countries.**
- World Health Organization, 2008. **World malaria report 2008.** Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, 2010. **Malaria**
- Wright CW, 2004. Pharmacological properties of the active constituents of some tradional in: **Traditional medicinal plants and malaria,** edited Willcox, CRC press, New York.
- Wright CW, 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J Etnopharmacol* 100: 67-71.
- Yayon A, Vande Waa JA, Yayon M, Geary TG and Jensen JB, 1983. Stage-dependent effects of chloroquine on *Plasmodium falciparum in vitro*. *The Journal of Protozoologi* 30 (4): 642-7.

LAMPIRAN 1

HASIL SPEKTRA ISOLAT 2 (CASSIARIN A)

CSM53_CD3OD CDC13_PROTON



Elsal
lute
Kamus Herbal

```

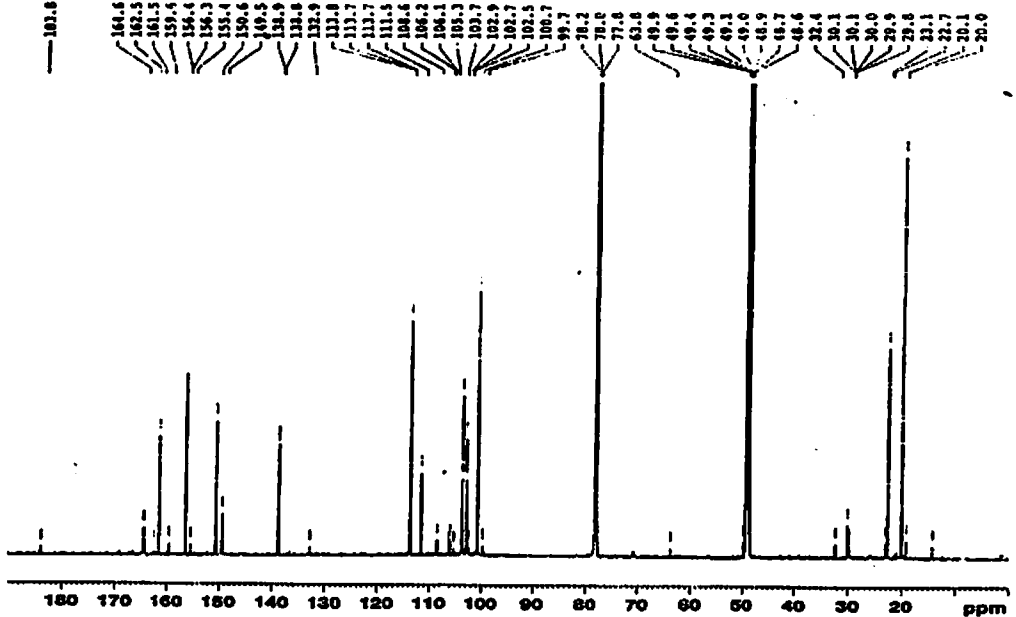
===== Data Parameter =====
NAME  C06098_NMR_01
EXPNO  2
PROCNO  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_   20211111
Time    23:21
INSTRUM  spect
PROBHD  5 mm CPUL 13C
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  CDCl3
AQ       1.64
RG       327
DS       4
SWH      8415.385 Hz
FIDRES   0.168749 Hz
AQ       3.407876 sec
RG       28.0
DS       53.888 rev
DE       6.00 um
TE       303.2 K
D1       1.00000000 sec
dPRG01  0
dPRG02  0
dPRG03  0
===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       15.00 nsec
PL1      -1.20 dB
SFO1     400.1464000 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       400.1464000 MHz
WDW      EM
SSB      0
GB       0
PC       0.30 sec
DC       0
SC       1.00
  
```

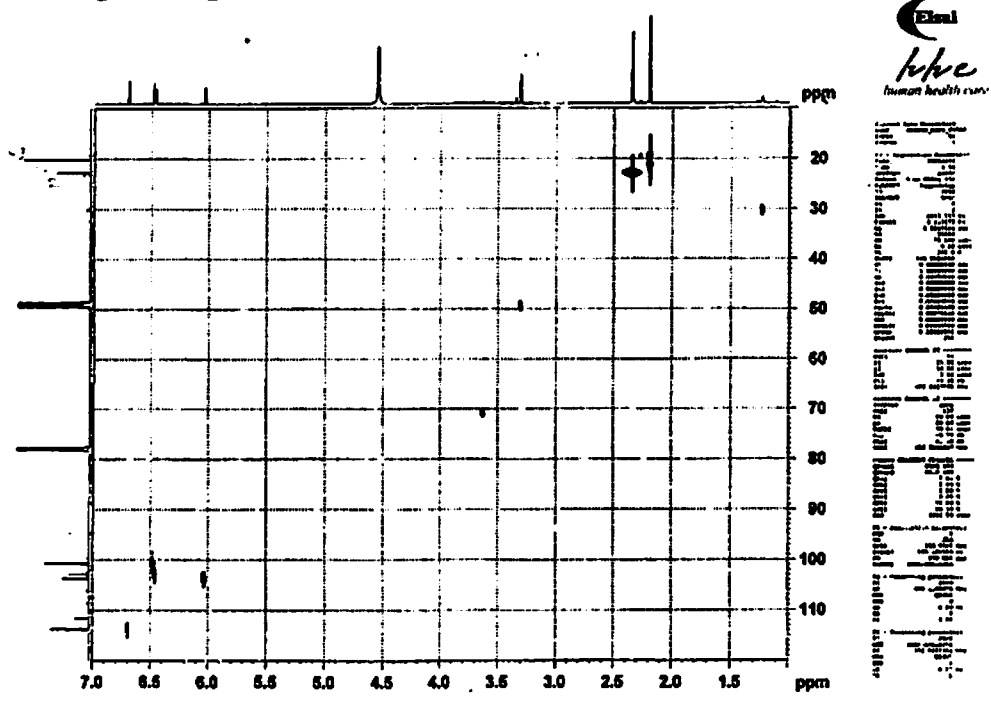
1.1 Spektrum RMI-¹H isolat 2 dalam CDCl₃/CD₃OD

CSM53_CD3OD CDC13_CARBON



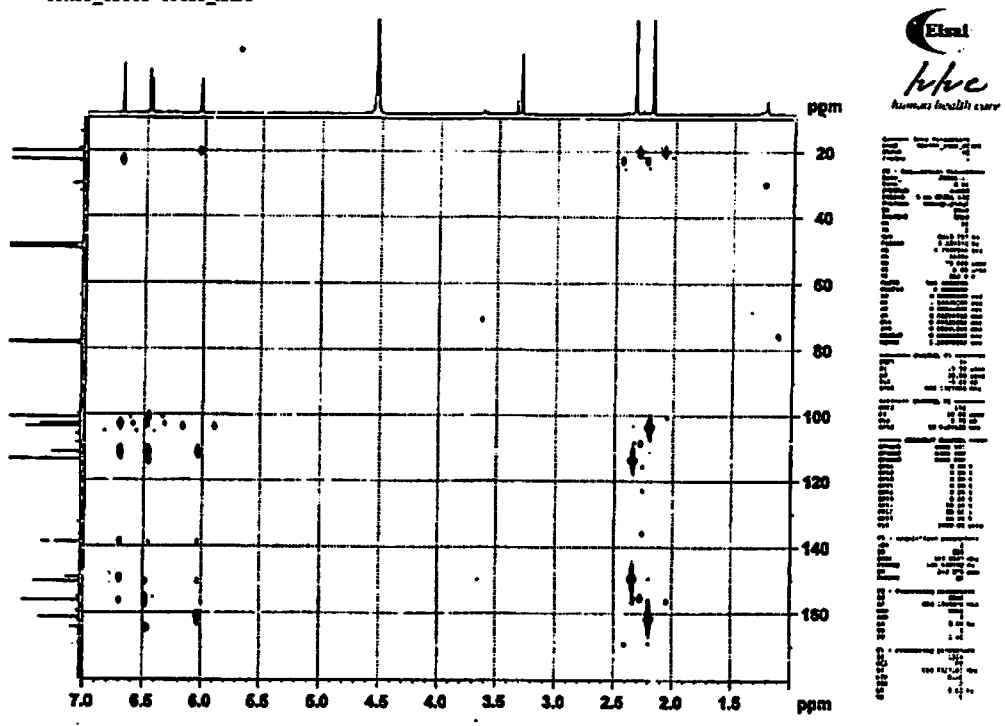
1.2 Spektrum RMI-¹³C isolat 2 dalam CDCl₃/CD₃OD

CSMS3_CD30D CDC13_HSQCED



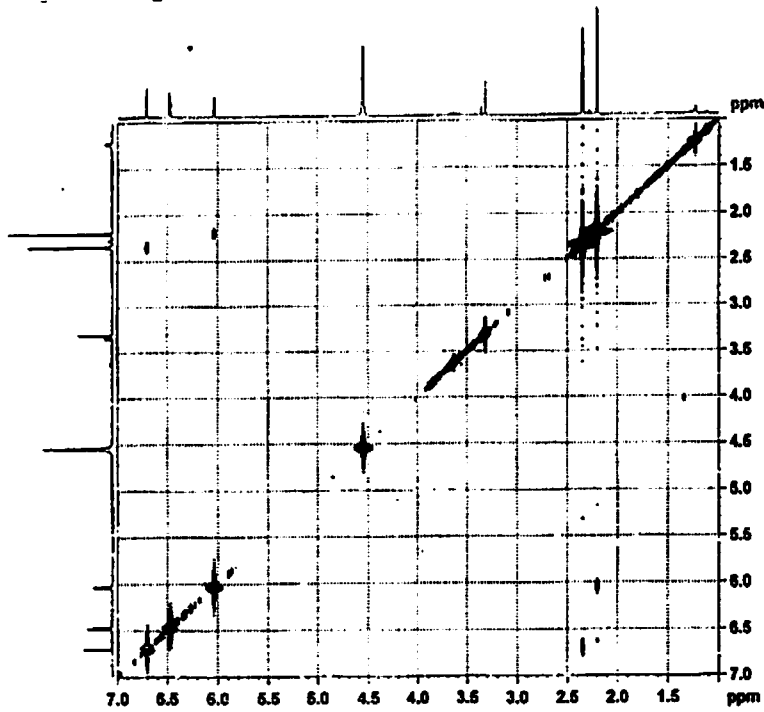
1.3 Spektrum RMI HSQCED isolat 2

CSMS3_CD30D CDC13_HMBC



1.4 Spektrum RMI HMBC isolat 2

ISMS1_CD30D CDC13_COSY

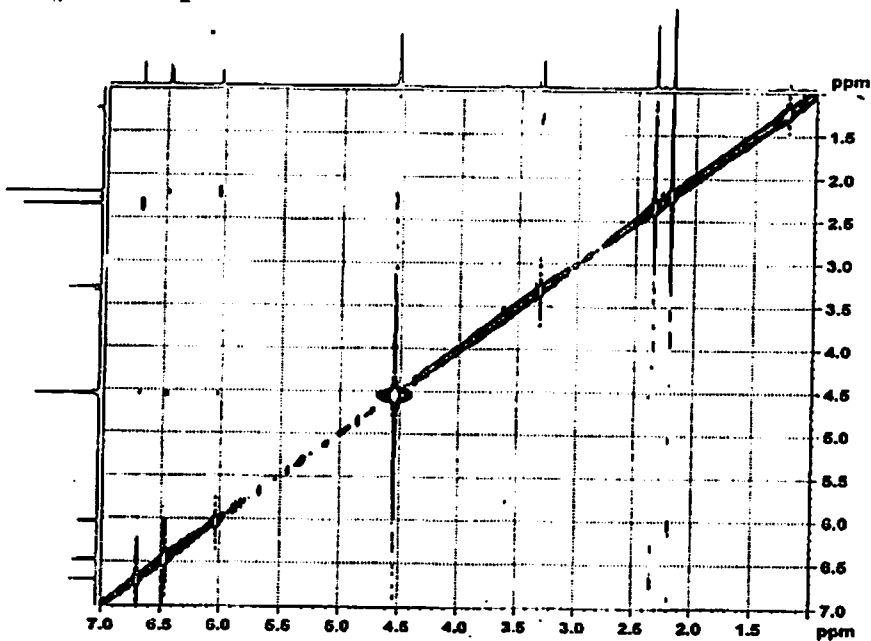


```

Current Data Parameters
Name: ISMS1_CD30D
Date_: 20080808
Time: 10.00
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm QNP1H/1
PULPROG: zgpg30
PC: 1024
SOLVANI: DMS-d6
NS: 1024
DS: 4
AQ: 4.123770
RG: 312.500
AQ2: 1.000000
RG2: 128
AQ3: 1.000000
RG3: 128
AQ4: 1.000000
RG4: 128
AQ5: 1.000000
RG5: 128
AQ6: 1.000000
RG6: 128
AQ7: 1.000000
RG7: 128
AQ8: 1.000000
RG8: 128
AQ9: 1.000000
RG9: 128
AQ10: 1.000000
RG10: 128
AQ11: 1.000000
RG11: 128
AQ12: 1.000000
RG12: 128
AQ13: 1.000000
RG13: 128
AQ14: 1.000000
RG14: 128
AQ15: 1.000000
RG15: 128
AQ16: 1.000000
RG16: 128
AQ17: 1.000000
RG17: 128
AQ18: 1.000000
RG18: 128
AQ19: 1.000000
RG19: 128
AQ20: 1.000000
RG20: 128
AQ21: 1.000000
RG21: 128
AQ22: 1.000000
RG22: 128
AQ23: 1.000000
RG23: 128
AQ24: 1.000000
RG24: 128
AQ25: 1.000000
RG25: 128
AQ26: 1.000000
RG26: 128
AQ27: 1.000000
RG27: 128
AQ28: 1.000000
RG28: 128
AQ29: 1.000000
RG29: 128
AQ30: 1.000000
RG30: 128
AQ31: 1.000000
RG31: 128
AQ32: 1.000000
RG32: 128
AQ33: 1.000000
RG33: 128
AQ34: 1.000000
RG34: 128
AQ35: 1.000000
RG35: 128
AQ36: 1.000000
RG36: 128
AQ37: 1.000000
RG37: 128
AQ38: 1.000000
RG38: 128
AQ39: 1.000000
RG39: 128
AQ40: 1.000000
RG40: 128
AQ41: 1.000000
RG41: 128
AQ42: 1.000000
RG42: 128
AQ43: 1.000000
RG43: 128
AQ44: 1.000000
RG44: 128
AQ45: 1.000000
RG45: 128
AQ46: 1.000000
RG46: 128
AQ47: 1.000000
RG47: 128
AQ48: 1.000000
RG48: 128
AQ49: 1.000000
RG49: 128
AQ50: 1.000000
RG50: 128
AQ51: 1.000000
RG51: 128
AQ52: 1.000000
RG52: 128
AQ53: 1.000000
RG53: 128
AQ54: 1.000000
RG54: 128
AQ55: 1.000000
RG55: 128
AQ56: 1.000000
RG56: 128
AQ57: 1.000000
RG57: 128
AQ58: 1.000000
RG58: 128
AQ59: 1.000000
RG59: 128
AQ60: 1.000000
RG60: 128
AQ61: 1.000000
RG61: 128
AQ62: 1.000000
RG62: 128
AQ63: 1.000000
RG63: 128
AQ64: 1.000000
RG64: 128
AQ65: 1.000000
RG65: 128
AQ66: 1.000000
RG66: 128
AQ67: 1.000000
RG67: 128
AQ68: 1.000000
RG68: 128
AQ69: 1.000000
RG69: 128
AQ70: 1.000000
RG70: 128
AQ71: 1.000000
RG71: 128
AQ72: 1.000000
RG72: 128
AQ73: 1.000000
RG73: 128
AQ74: 1.000000
RG74: 128
AQ75: 1.000000
RG75: 128
AQ76: 1.000000
RG76: 128
AQ77: 1.000000
RG77: 128
AQ78: 1.000000
RG78: 128
AQ79: 1.000000
RG79: 128
AQ80: 1.000000
RG80: 128
AQ81: 1.000000
RG81: 128
AQ82: 1.000000
RG82: 128
AQ83: 1.000000
RG83: 128
AQ84: 1.000000
RG84: 128
AQ85: 1.000000
RG85: 128
AQ86: 1.000000
RG86: 128
AQ87: 1.000000
RG87: 128
AQ88: 1.000000
RG88: 128
AQ89: 1.000000
RG89: 128
AQ90: 1.000000
RG90: 128
AQ91: 1.000000
RG91: 128
AQ92: 1.000000
RG92: 128
AQ93: 1.000000
RG93: 128
AQ94: 1.000000
RG94: 128
AQ95: 1.000000
RG95: 128
AQ96: 1.000000
RG96: 128
AQ97: 1.000000
RG97: 128
AQ98: 1.000000
RG98: 128
AQ99: 1.000000
RG99: 128
AQ100: 1.000000
RG100: 128
  
```

1.5 Spektrum RMI COSY isolat 2

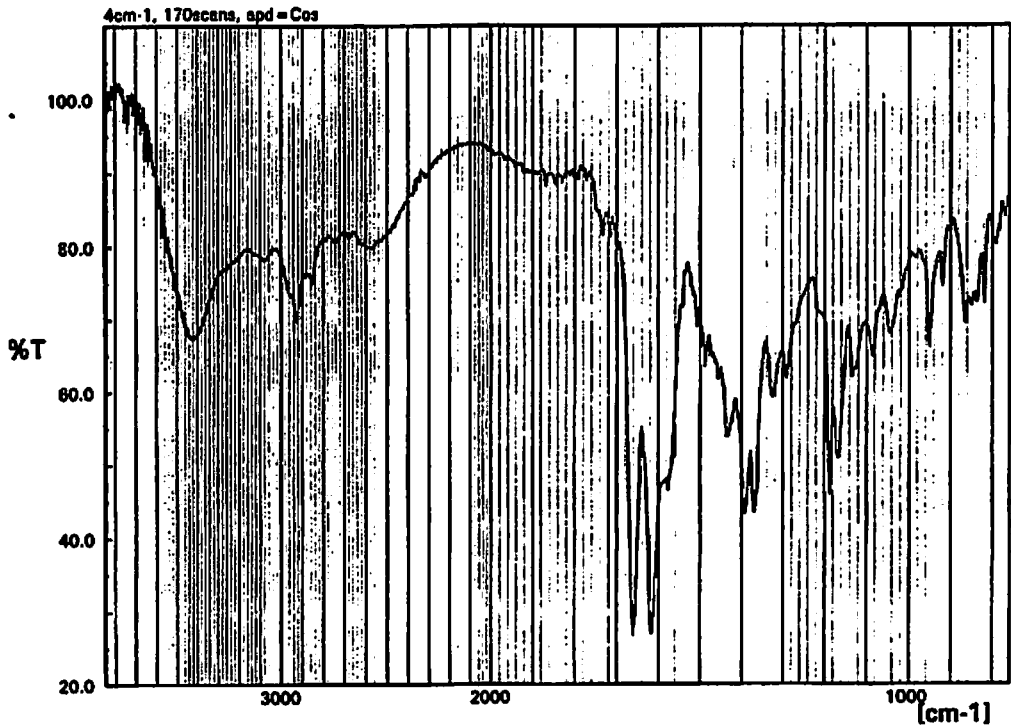
CSM51_CD30D CDC13_NOESY



```

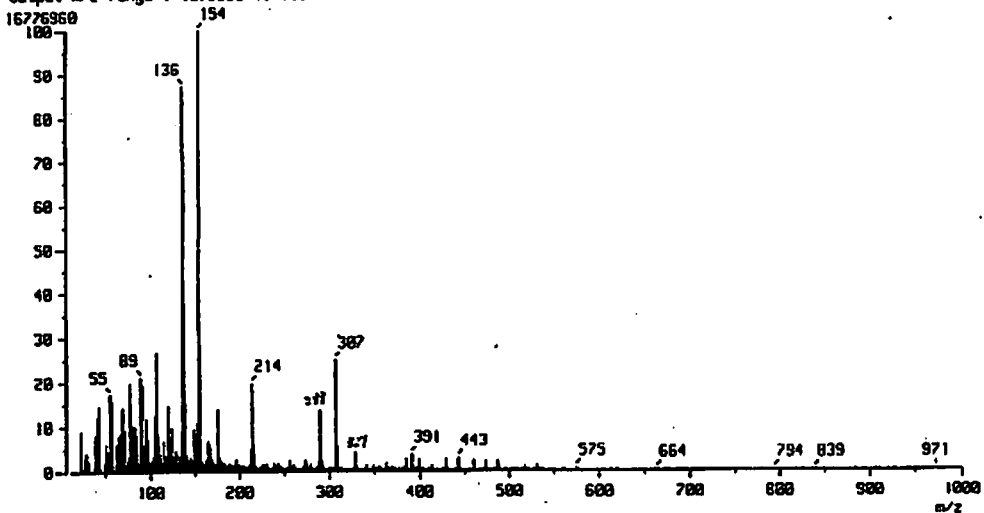
Current Data Parameters
Name: CSM51_CD30D
Date_: 20080808
Time: 10.00
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm QNP1H/1
PULPROG: zgpg30
PC: 1024
SOLVANI: DMS-d6
NS: 1024
DS: 4
AQ: 4.123770
RG: 312.500
AQ2: 1.000000
RG2: 128
AQ3: 1.000000
RG3: 128
AQ4: 1.000000
RG4: 128
AQ5: 1.000000
RG5: 128
AQ6: 1.000000
RG6: 128
AQ7: 1.000000
RG7: 128
AQ8: 1.000000
RG8: 128
AQ9: 1.000000
RG9: 128
AQ10: 1.000000
RG10: 128
AQ11: 1.000000
RG11: 128
AQ12: 1.000000
RG12: 128
AQ13: 1.000000
RG13: 128
AQ14: 1.000000
RG14: 128
AQ15: 1.000000
RG15: 128
AQ16: 1.000000
RG16: 128
AQ17: 1.000000
RG17: 128
AQ18: 1.000000
RG18: 128
AQ19: 1.000000
RG19: 128
AQ20: 1.000000
RG20: 128
AQ21: 1.000000
RG21: 128
AQ22: 1.000000
RG22: 128
AQ23: 1.000000
RG23: 128
AQ24: 1.000000
RG24: 128
AQ25: 1.000000
RG25: 128
AQ26: 1.000000
RG26: 128
AQ27: 1.000000
RG27: 128
AQ28: 1.000000
RG28: 128
AQ29: 1.000000
RG29: 128
AQ30: 1.000000
RG30: 128
AQ31: 1.000000
RG31: 128
AQ32: 1.000000
RG32: 128
AQ33: 1.000000
RG33: 128
AQ34: 1.000000
RG34: 128
AQ35: 1.000000
RG35: 128
AQ36: 1.000000
RG36: 128
AQ37: 1.000000
RG37: 128
AQ38: 1.000000
RG38: 128
AQ39: 1.000000
RG39: 128
AQ40: 1.000000
RG40: 128
AQ41: 1.000000
RG41: 128
AQ42: 1.000000
RG42: 128
AQ43: 1.000000
RG43: 128
AQ44: 1.000000
RG44: 128
AQ45: 1.000000
RG45: 128
AQ46: 1.000000
RG46: 128
AQ47: 1.000000
RG47: 128
AQ48: 1.000000
RG48: 128
AQ49: 1.000000
RG49: 128
AQ50: 1.000000
RG50: 128
AQ51: 1.000000
RG51: 128
AQ52: 1.000000
RG52: 128
AQ53: 1.000000
RG53: 128
AQ54: 1.000000
RG54: 128
AQ55: 1.000000
RG55: 128
AQ56: 1.000000
RG56: 128
AQ57: 1.000000
RG57: 128
AQ58: 1.000000
RG58: 128
AQ59: 1.000000
RG59: 128
AQ60: 1.000000
RG60: 128
AQ61: 1.000000
RG61: 128
AQ62: 1.000000
RG62: 128
AQ63: 1.000000
RG63: 128
AQ64: 1.000000
RG64: 128
AQ65: 1.000000
RG65: 128
AQ66: 1.000000
RG66: 128
AQ67: 1.000000
RG67: 128
AQ68: 1.000000
RG68: 128
AQ69: 1.000000
RG69: 128
AQ70: 1.000000
RG70: 128
AQ71: 1.000000
RG71: 128
AQ72: 1.000000
RG72: 128
AQ73: 1.000000
RG73: 128
AQ74: 1.000000
RG74: 128
AQ75: 1.000000
RG75: 128
AQ76: 1.000000
RG76: 128
AQ77: 1.000000
RG77: 128
AQ78: 1.000000
RG78: 128
AQ79: 1.000000
RG79: 128
AQ80: 1.000000
RG80: 128
AQ81: 1.000000
RG81: 128
AQ82: 1.000000
RG82: 128
AQ83: 1.000000
RG83: 128
AQ84: 1.000000
RG84: 128
AQ85: 1.000000
RG85: 128
AQ86: 1.000000
RG86: 128
AQ87: 1.000000
RG87: 128
AQ88: 1.000000
RG88: 128
AQ89: 1.000000
RG89: 128
AQ90: 1.000000
RG90: 128
AQ91: 1.000000
RG91: 128
AQ92: 1.000000
RG92: 128
AQ93: 1.000000
RG93: 128
AQ94: 1.000000
RG94: 128
AQ95: 1.000000
RG95: 128
AQ96: 1.000000
RG96: 128
AQ97: 1.000000
RG97: 128
AQ98: 1.000000
RG98: 128
AQ99: 1.000000
RG99: 128
AQ100: 1.000000
RG100: 128
  
```

1.6 Spektrum RMI NOESY isolat 2



1.7 Spektrum IR dari isolat 2

[Mass Spectrum]
 Date : 18-Nov-1986 09:36
 Sample: C5H53 MeOH NFA
 Note : JMS-SX102A00 MDA-0423-01
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Regular [MF-Linear]
 RT : 0.10 min Scan# : 2 Temp : 121.8 deg.C
 BP : m/z 154.0000 Int. : 1539.98
 Output m/z range : 18.0000 to 1000.0000 Cut Level : 0.00 %
 16276960



1.8 Spektrum MS isolat 2

