

KESEHATAN

LAPORAN
Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch II
(~~Klaster Gizi & Kesehatan~~)
Tahun Anggaran 2009



**ISOLAT DAUN *CASSIA SIAMEA* SEBAGAI
ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM**

Dr. Indah S. Tantular, M.Kes
Dra. Wiwied Ekasari, Apt., M.Si.
Dr. Aty Widyawaruyanti, M.Si.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor: 300/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juni 2009

Universitas Airlangga
November 2009

KESEHATAN

LAPORAN
Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch II
(Klaster Gizi & Kesehatan)
Tahun Anggaran 2009

KFB
Kb-2
LP.192/10
Tan
i



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**ISOLAT DAUN *CASSIA SIAMEA* SEBAGAI
ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM**

Dr. Indah S. Tantular, M.Kes
Dra. Wiwied Ekasari, Apt., M.Si.
Dr. Aty Widyawaruyanti, M.Si.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor: 300/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juni 2009

Universitas Airlangga
November 2009

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Isolat Daun *Cassia siamea* Sebagai Antimalaria dari Bahan Alam

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : dr. Indah Tantular, M.Kes, PhD
 b. Jenis Kelamin : P
 c. NIP : 131 954 058
 d. Pangkat/golongan : III d
 e. Jabatan fungsional : Lektor
 f. Bidang Keahlian : Parasitologi
 g. Fakultas/Jurusan : Farmasi Universitas Airlangga
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS /JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Dra. Wiwied Ekasari, Apt., MSi	Farmakognosi	Farmasi	UNAIR
2.	Dr. Aty Widyawaruyanti, Apt. MSi	Fitokimia	Farmasi	UNAIR

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. 100.000.000

Mengetahui :
 Dekan Fakultas Farmasi UNAIR

Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, Apt
 NIP. 130809077

Surabaya, November 2009\

Ketua Peneliti,

dr. Indah Tantular, M.Kes, PhD
 NIP. 131 954 058

Menyetujui :

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair,

Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA., drh.
 NIP 131 837 004

RINGKASAN

ISOLAT DAUN *CASSIA SIAMEA* SEBAGAI ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM
(Indah Tantular, Wiwied Ekasari, Aty Widyawaruyanti)

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 beresiko 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. 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 famili Caesalpiniaceae telah lama digunakan secara tradisional untuk mengobati malaria. Penelitian pendahuluan dari ekstrak sampai fraksi alkaloid dari daun ini menunjukkan adanya aktivitas antimalaria yang potensial baik secara *in vitro* terhadap *P. falciparum*, maupun secara *in vivo* terhadap *P. berghei*.

Untuk itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* serta mekanisme aksinya.

Pemisahan fraksi kloroform yang didapat dari ekstrak metanol yang diekstraksi kembali dengan etil asetat dan asam tartrat 3% dengan kromatografi kolom menggunakan eluen bertingkat menghasilkan 11 fraksi, yang mana pada fraksi 8 menghasilkan senyawa cassiarin B. Selanjutnya pada fraksi 5 dipisahkan lagi dengan kromatografi kolom dan menghasilkan dua senyawa yaitu anhidrobarakol dan senyawa cassiarin A.

Uji aktifitas antimalaria terhadap ketiga senyawa hasil isolasi secara *in vitro* terhadap *P. falciparum* 3D7 menunjukkan bahwa cassiarin A paling potensial dibanding isolat lainnya dengan IC_{50} sebesar 0,001 $\mu\text{g/ml}$. Begitupula terhadap *P. falciparum* strain G2300 yang resisten klorokuin memperlihatkan bahwa cassiarin A mempunyai aktivitas yang paling poten dengan harga IC_{50} sebesar 0,035 $\mu\text{g/ml}$. Sedang hasil uji *in vivo* terhadap mencit terinfeksi *P. berghei* dari cassiarin A menunjukkan harga ED_{50} sebesar 0,17 mg/kgBB sedang klorokuin difosfat sebesar 0,21 mg/kgBB.

Uji mekanisme aksi dari senyawa cassiarin A dengan menggunakan uji hambatan pada proses degradasi hemoglobin dengan menggunakan SDS-PAGE dan hambatan detoksifikasi heme dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi menunjukkan bahwa cassiarin A menghambat semua proses tersebut.

Hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa aktif antimalaria dari daun *C. siamea* Lamk memiliki aktivitas antimalaria yang poten secara *in vitro* dan *in vivo*, melalui hambatan proses degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme. Oleh karena itu, cassiarin A sangat potensial untuk dikembangkan sebagai obat antimalaria baru.

SUMMARY

Malaria represents a hitherto serious health problem. It was reported that in 2006 there were 274 millions malarial cases of 3.3 billions of world's population at risk of malaria leading to almost one million deaths. Recent data indicated that as much as 109 countries were identified as epidemic regions of malarial disease in 2008. Efforts of malarial eradication is encountering a variety of problems, especially an emergence of parasitic resistant to existing antimalarial drugs and unavailability of ideal anti-malarial vaccines. Hence, efforts to discover novel antimalarial drugs represent a main priority of malarial eradication programs.

Cassia siamea Lamk (or *Johar* in the vernacular) of family Caesalpiniaceae has long been used traditionally to treat malaria. Preliminary analysis of this leaf from its extracts to alkaloid fractions indicated a potent antimalarial activity against both *P. falciparum* *in vitro* as well as *P. berghei* *in vivo*.

The purpose of the present research was to determine antimalarial activity of an isolate of *C. siamea* Lamk leaves and to establish biochemical targets and its effects on the morphology of malarial parasites.

Separation of chloroform fraction obtained from methanol extracts re-extracted with ethyl acetate and 3% tartaric acid with column chromatography using gradient eluent produced 11 fractions, in which fraction 8 produced cassiarin B. Fraction 5 was then separated again with column chromatography and produced two compounds of anhydrobarakol and cassiarin A.

In vitro assays of antimalarial activity of those five isolates against *P. falciparum* 3D7 indicated that cassiarin A was most potent among other isolates with IC_{50} of 0,001 $\mu\text{g/ml}$. Other *in vitro* assays in *P. falciparum* strain G2300 resistant to chloroquine showed IC_{50} values of 0.035 $\mu\text{g/ml}$ for cassiarin A, respectively. *In vivo* assays in *P. berghei*-infected mice indicated ED_{50} values of 0.17 and 0.21 mg/kg body weight for cassiarin A and chloroquine diphosphate, respectively.

Identification of biochemical targets of cassiarin A using inhibition test of processes of hemoglobin degradation and heme detoxification indicated that cassiarin A inhibited all those processes. Results indicated that an active antimalarial constituent of *C. siamea* Lamk leaves possessed both *in vitro* and *in vivo* potent antimalarial activity through inhibiting processes of hemoglobin degradation, and heme detoxification. Hence, cassiarin A was highly potential as candidate for novel antimalarials.

PRAKATA

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

ISOLAT DAUN *CASSIA SLAMEA* SEBAGAI ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM

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, November 2009

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan tentang Tanaman <i>C. Siamea</i>	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman.....	5
2.1.2 Deskripsi tentang Tanaman Johar (<i>C. siamea</i>).....	5
2.2 Studi Pendahuluan yang telah Dilakukan.....	6
2.3 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam.....	9
2.3.1 Kromatografi.....	10
2.3.1.1 Kromatografi Lapis Tipis	10
2.3.1.2 Kromatografi Kolom	11
2.4 Tinjauan tentang Spektroskopi	11
2.4.1 Spektroskopi Infra Merah.....	11
2.4.2 Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (RMI).....	12
2.5 Tinjauan Uji Aktivitas Antimalaria secara <i>in vitro</i>	14
2.6 Tinjauan tentang Uji Aktivitas Antimalaria secara <i>in vivo</i>	15
2.7 Degradasi Hemoglobin dalam Vakuola Makanan.....	16
2.8 Detoksifikasi Heme Parasit Malaria	18
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	24
4.1 Bahan Penelitian	24
4.1.1 Bahan Tanaman	24
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	24
4.2.1 Lokasi Penelitian	24
4.2.2 Waktu penelitian.....	24
4.3 Prosedur Pengambilan/Pengumpulan Data.....	24
4.3.1 Persiapan Sampel Penelitian.....	24
4.3.1.1 Isolasi Daun <i>C. siamea</i> Lamk	25
4.3.2 Identifikasi Isolat	25
4.3.2.1 Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	25
4.3.2.2 Identifikasi dengan Spektrometri Infra Merah	26
4.3.2.3 Identifikasi dengan Spektrometri RMI	26
4.3.3 Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vitro</i>	26
4.3.3.1 Persiapan Medium Tak Lengkap (<i>Incomplete Medium</i>)	26
4.3.3.2 Persiapan Serum	26
4.3.3.3 Persiapan Medium Lengkap	26
4.3.3.4 Persiapan Eritrosit 50%	27



4.3.3.5	Prosedur Biakan.....	27
4.3.3.6	Penyiapan Bahan Uji	28
4.3.3.7	Prosedur Pengujian.....	28
4.3.3.8	Evaluasi Hasil Uji Efek Antimalaria	29
4.3.3.9	Analisa Data.....	29
4.3.4	Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vivo</i>	30
4.3.4.1	Penyiapan <i>P. berghei</i> untuk Penginfeksi Mencit Donor.....	30
4.3.4.2	Penyiapan <i>P. berghei</i> untuk Penginfeksi Mencit Coba	30
4.3.4.3	Prosedure Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vivo</i>	30
4.3.4.4	Analisis Data.....	31
4.3.5	Uji Hambatan Degradasi Hemoglobin (Pandey <i>et al.</i> , 1999).....	31
4.3.6	Uji Hambatan Degradasi Hemoglobin dengan Pengamatan Morfologi Menggunakan Mikroskop Elektron Transmisi (Aikawa, 1971; Bozzola dan Russell, 1998).....	33
BAB 5	HASIL PENELITIAN.....	37
5.1	Hasil Isolasi Daun <i>C. siamea</i> Lamk	37
5.1.1	Identifikasi Isolat 1, Isolat 2 dan Isolat 3.....	41
5.1.1.1	Hasil Identifikasi Isolat 1.....	41
5.1.1.1.1	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri RMI	41
5.1.1.1.2	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri Massa.....	41
5.1.1.1.3	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri FT-IR.....	42
5.1.1.2	Hasil Identifikasi Isolat 2.....	42
5.1.1.2.1	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri RMI	42
5.1.1.2.2	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrometri Massa	42
5.1.1.2.3	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri FT-IR.....	43
5.1.1.3	Hasil Identifikasi Isolat 3.....	43
5.1.1.3.1	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrometri RMI.....	43
5.1.1.3.2	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri Massa.....	43
5.1.1.3.3	Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri FT-IR.....	44
5.2	Hasil Uji Antimalaria secara <i>In Vitro</i> dari Senyawa Hasil Isolasi Daun <i>C. siamea</i> Lamk	44
5.3	Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Cassiarin A Daun <i>C. siamea</i> Lamk terhadap <i>P. berghei</i> secara <i>In vivo</i> pada Hewan Coba Mencit	46
5.4	Hasil Uji Efek Senyawa Aktif Antimalaria terhadap Degradasi Hemoglobin	50
5.5	Hasil Uji adanya hambatan detoksifikasi heme dengan pengamatan Transmisi Electron Microscop (TEM).....	51
BAB 6	PEMBAHASAN.....	53
6.1	Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi Daun <i>C. siamea</i> Lamk.....	53
6.1.1	Identifikasi Isolat 1	53
6.1.2	Identifikasi Isolat 2	54
6.1.3	Identifikasi Isolat 3	55
6.2	Aktivitas Antimalaria Senyawa Hasil Isolasi Daun <i>C. siamea</i> Lamk terhadap <i>P. falciparum in vitro</i>	57
6.3	Efek Cassiarin A pada Proses Degradasi Hemoglobin.....	58
6.4	Efek Senyawa Cassiarin A pada Proses detoksifikasi Heme.....	60
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN	62

6.1 Kesimpulan.....	62
6.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 : Data spektrum RMI- ¹ H dan RMI- ¹³ C isolat 1	41
Tabel 5.2 : Data spektrum RMI- ¹ H dan RMI- ¹³ C dari isolat 2.....	42
Tabel 5.3 : Data spektrum RMI- ¹ H dan RMI- ¹³ C isolat 3	43
Tabel 5.4 : Nilai IC ₅₀ dari senyawa hasil isolasi daun <i>C. siamea</i> Lamk pada uji antimalaria <i>in vitro</i> terhadap <i>P. falciparum</i> 3D7	44
Tabel 5.5 : Nilai IC ₅₀ dari senyawa hasil isolasi daun <i>C. siamea</i> Lamk pada uji antimalaria <i>in vitro</i> terhadap <i>P. falciparum</i> G2300.....	45
Tabel 5.6 : Persen parasitemia senyawa Cassiarin A dari daun <i>C. siamea</i> pada H0-H4.....	46
Tabel 5.7 : Persen parasitemia klorokuin difosfat pada H0-H4.....	47
Tabel 5.8 : Rata-rata persen parasitemia dari <i>P. berghei</i> setelah pemberian cassiarin A, klorokuin difosfat dan kontrol negatif selama 4 hari secara i.p.	48
Tabel 5.9 : Aktivitas antimalaria Cassiarin A dan klorokuin difosfat terhadap mencit terinfeksi <i>P. berghei</i> secara i.p selama 4 hari pemberian	49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Gambar Pohon (A), Bunga (B) dan Daun <i>C. siamea</i> (C)	5
Gambar 4.1 : Bagan alir penelitian	36
Gambar 5.1 : Skema isolasi isolat 1, isolat 2 dan isolat 3 dari daun <i>C. siamea</i> ...	38
Gambar 5.2 : Kromatogram hasil KLT dari ekstrak kloroform daun <i>C. siamea</i> Lamk dengan bermacam-macam fase gerak menggunakan penampak noda Dragendorf	39
Gambar 5.3 : Kromatogram hasil KLT Fraksi 1-9 dari daun <i>C. siamea</i> Lamk dengan menggunakan eluen CHCl_3 : Metanol = 8 : 2 dan penampak noda Dragendorf	40
Gambar 5.4 : Kromatogram hasil KLT Fraksi C5.1 – C5.4 dari daun <i>C. siamea</i> Lamk dengan menggunakan Eluen CHCl_3 : Metanol = 17 : 3 dan penampak noda Dragendorf	40
Gambar 5.5 : Grafik rata-rata persen penghambatan senyawa cassiarin A dan klorokuin difosfat terhadap <i>P. Falciparum</i> G2300	45
Gambar 5.6 : Grafik persen parasitemia hasil pemberian cassiarin A dan kontrol negatif mulai H0-H4	48
Gambar 5.7 : Grafik persen parasitemia hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif mulai H0-H4	49
Gambar 5.8 : Pengaruh cassiarin A pada A, % pertumbuhan parasit dan B % penghambatan parasit pada mencit terinfeksi <i>P. berghei</i> secara in vivo	50
Gambar 5.9 : Hasil Elektroforesis <i>P.falciparum</i> pada pemberian senyawa aktif dibandingkan dengan marker	50
Gambar 5.10 : Pada 1 (a,) (b) dan (c) dapat dilihat adanya bentukan hemozoin yang sempurna pada kultur tanpa pemberian bahan uji, pada 1 (d) dan (e) adalah kultur dengan pemberian cassiarin A dengan masa inkubasi 12 jam terlihat masih adanya sedikit hemozoin yang sudah tidak sempurna dan pada 1 (f) dan (g) pada kultur yang diberi cassiarin A dengan masa inkubasi 24 jam sudah tidak terlihat lagi adanya hemozoin	52

BAB I

PENDAHULUAN

Malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat, di lebih dari 90 negara, yang dihuni oleh sekitar 2,4 milyar penduduk, atau 40% dari total penduduk dunia. Prevalensi penyakit malaria di dunia diperkirakan 500 juta kasus klinis setiap tahun dengan angka kematian lebih dari satu juta orang per tahun (Greenwood, 2004). Pada tahun 1998, WHO meluncurkan suatu kampanye penanggulangan malaria yaitu *Roll Back Malaria* (RBM) yang bertujuan menurunkan angka kematian malaria sampai separuh dari yang ada pada saat itu. Saat ini RBM telah bekerja separuh jalan, namun statistik WHO menunjukkan bahwa angka kematian malaria malah cenderung meningkat (Attaran, 2004). Angka kesakitan malaria di Indonesia sendiri dilaporkan 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 (WHO, 2006).

Tumbuh dan menyebarnya resistensi terhadap semua obat antimalaria lapis pertama yang dipakai pada pengobatan dan pencegahan malaria telah menimbulkan banyak masalah pada penanggulangan malaria. Seiring dengan belum berhasilnya upaya untuk menemukan vaksin malaria yang ideal, maka aktivitas riset yang bertujuan untuk mengidentifikasi target intervensi kemoterapi dan penemuan obat baru menjadi tujuan utama dalam upaya penanggulangan malaria (Burke, 2003; Sjafruddin, 2004).

Salah satu kendala pemberantasan malaria adalah timbulnya resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria yang telah ada. Resistensi dari obat-obatan antimalaria yang ada sekarang ini terhadap *P. falciparum* sangat mengkhawatirkan, karena resistensi



parasit menyebabkan berkurangnya aktivitas obat antimalaria (Biagini, 2003). Selama bertahun-tahun klorokuin telah digunakan sebagai pengobatan malaria. Namun kini hampir di seluruh negara endemik malaria telah ditemukan resistensi *Plasmodium* terhadap klorokuin. Lebih daripada itu resistensi dari *Plasmodium falciparum* telah berkembang untuk obat antimalaria yang lain. Perkembangan resistensi pada obat-obat malaria lapis pertama (*front-line antimalaria compound*) yang digunakan dalam pencegahan dan pengobatan malaria di dasawarsa terakhir ini merupakan problem utama dalam penanggulangan malaria. *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin telah ditemukan di seluruh bagian negara tropis di dunia, yaitu Afrika Timur, Pasifik Barat, Asia Barat, Asia Tenggara dan sekitarnya, termasuk Bangladesh, Butan, India, Indonesia, Myanmar dan Thailand (WHO, 2003; Krettli, 2001).

Berbagai hal tersebut di atas telah mendorong eksplorasi dan isolasi tanaman obat lainnya begitu pula yang berasal dari Indonesia, 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* dan didapatkan hasil bahwa fraksi alkaloid daun *C. siamea* mempunyai aktivitas antimalaria yang sangat potensial terhadap *P. falciparum* (Ekasari, 2005; Ekasari, 2006)

Berdasarkan hal tersebut di atas maka perlu pula dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa dari golongan alkaloid yang terkandung dalam tanaman ini serta menguji aktivitasnya terhadap *P. falciparum* sensitive dan resisten klorokuin.

Guna mendapatkan data aktivitas antimalaria lebih lengkap, maka selanjutnya pada senyawa aktif hasil isolasi daun *C. siamea* akan dilakukan pula uji aktivitas antimalarianya secara *in vivo* pada hewan coba mencit. Uji secara *in vivo* dapat menggambarkan aktivitas obat terhadap kondisi parasit secara langsung di tubuh inang.

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

Selanjutnya sampai saat ini belum pernah dilaporkan mekanisme senyawa dari daun *C. siamea* dalam aktivitasnya menghambat pertumbuhan parasit. Sebagaimana diketahui bahwa, *Plasmodium* saat berada intraeritrositik pada sel host, akan memisahkan mereka dari suplai nutrisi yang terdapat dalam sirkulasi darah. Untuk mengatasi hal tersebut, *Plasmodium* mengembangkan mekanisme baru untuk membawa dan mendapatkan nutrisi dari sitosol eritrosit yang ditempatinya. Hemoglobin sebagai sumber nutrisi utama (lebih dari 75%) ditranspor dari sitosol eritrosit ke dalam vakuola makanan dan akan didegradasi secara proteolisis. Proses degradasi hemoglobin menjadi globin dan selanjutnya didegradasi menjadi oligo peptida oleh enzim protease akan menjadi asam amino bebas (*free amino acid*) untuk proses sintesis protein, bagi pertumbuhan dan maturasi parasit malaria (Sherman, 1998; Rosenthal, 2001; Banerjee *et al.*, 2002). Di lain sisi, pemecahan hemoglobin dalam jumlah besar, menghasilkan heme bebas yang toksik bagi parasit. Parasit malaria akan mengubah heme bebas tersebut menjadi hemozoin melalui proses detoksifikasi heme, sehingga parasit tersebut tetap *survive* di dalam

eritrosit (Gamboa and Rosenthal, 1996; Sherman, 1998; Wisner, 2001; Egan *et al*, 2000). Hal inilah yang merupakan target potensial obat antimalaria, dan diduga mekanisme tersebut dimiliki juga oleh senyawa alkaloid hasil isolasi daun *C. siamea*. Apabila senyawa aktif antimalaria bersifat sebagai inhibitor pada proses detoksifikasi heme, maka akan menyebabkan terjadinya penumpukan heme bebas pada vakuola makanan dan akan bersifat toksik sehingga melisis membran, mengakibatkan hemolisis dan menghambat aktivitas beberapa enzim. Hal ini berpengaruh pada metabolisme parasit dan menyebabkan kematian parasit (Sherman, 1998; Pandey *et al*, 1999; Wisner, 2004).

Gilles (1993) mengemukakan bahwa penelitian yang berhubungan dengan proses biokimiawi parasit malaria berperan penting untuk pengembangan obat antimalaria baru. Oleh karena itu, aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan parasit malaria sangat prospektif untuk diteliti terkait dengan penentuan mekanisme dan target potensial dari senyawa golongan alkaloid pada vakuola makanan parasit malaria.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tanaman *C. siamea*

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Suku : Caesalpiniaceae

Marga : *Cassia*

Jenis : *Cassia siamea* (Backer, 1963)

Nama daerah : Johar, Juwar (Heyne, 1987)



(A)



(B)



(C)

Gambar 2.1 Gambar Pohon (A), Bunga (B) dan Daun *C. siamea* (C)

2.1.2 Deskripsi tentang Tanaman Johar (*C. siamea*)

Johar (*C. siamea*) adalah tanaman asli daerah Sumatra sekitar katulistiwa. Merupakan salah satu jenis pohon yang banyak dibudidayakan di pulau Jawa dan banyak terdapat di sepanjang jalan sebagai pohon peneduh. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian 1000 m di atas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik (Heyne, 1987). Kandungan dari tanaman ini diantaranya adalah pada daun telah ditemukan oleh El-Sayyad (1984) senyawa alkaloid inti isokuinolin (siamina). Selain itu juga terdapat triterpenoid, dan senyawa golongan antrakinin (dioksifenalen, krisofanolantron). Sedang pada kayu/batang ditemukan tanin, antrakinin, lignin dan pentosa hidrosianat. Pada bunga juga terdapat senyawa alkaloid dengan inti kromom, yaitu Cassia denindihidroisokumarin, asam kumarat dan sterol (Harborne, 1971; Biswas, 1986).

2.2 Studi Pendahuluan yang telah Dilakukan

1. Gbeassor (1989), telah menguji efek antimalaria ekstrak air dari 8 tanaman di Afrika, diantaranya adalah *C. siamea* dan dinyatakan bahwa tanaman ini dapat menghambat 100% pertumbuhan *P. falciparum*.
2. Joke (1993), meneliti efek ekstrak kering metanol dari daun *C. siamea* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* F-2382 dan I-2300 (1993) didapatkan hasil bahwa ekstrak ini mempunyai IC_{50} untuk F-2382 = 28,07 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ dan untuk I-2300 = 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$.
3. Purwanto (1997) melakukan penelitian dengan mengekstraksi daun *C. siamea* menggunakan tiga macam pelarut yaitu n-heksana, kloroform, dan metanol. Dari uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* tersebut, diketahui ekstrak metanol tanaman ini mempunyai daya hambat yang terbesar. Ini ditunjukkan dengan harga

- IC₅₀ ekstrak n-heksana = 461,9553 µg/ml, ekstrak kloroform = 260,9156 µg/ml dan untuk ekstrak metanol = 1,8433 µg/ml. Dan dari skrining kandungan kimia untuk ekstrak metanol didapatkan hasil yang positif untuk golongan alkaloid.
4. Hadi (1997) melanjutkan meneliti aktivitas ekstrak n-heksana, kloroform dan metanol dari tanaman ini terhadap *P. falciparum* dari kulit batangnya. Dan didapatkan hasil bahwa ekstrak metanolnya juga menunjukkan daya hambat yang terbesar, namun dengan harga IC₅₀ yang lebih kecil dari daun yaitu untuk n-heksana IC₅₀ = 1893,75 µg/ml, ekstrak kloroform IC₅₀ = 959,83 µg/ml dan ekstrak metanol = 36,14 µg/ml. Sedang skrining kandungan kimia ekstrak metanolnya ternyata positif untuk golongan alkaloid, antrakuinon dan terpenoid.
 5. Ekasari W., Wahjo D., Yoes P.D. (2001), telah melakukan uji antimalaria *in vitro* dari ekstrak etanol, dan ekstrak kloroform daun *C. siamea* dan didapatkan hasil bahwa harga IC₅₀ dari ekstrak etanol adalah 7,06 µg/ml dan ekstrak kloroform = 2,41 µg/ml.
 6. Ekasari W., Wahjo D., Yoes P.D., dan Suhintam P. (2001), telah menguji efek antiplasmodium fraksi dari kloroform daun Johar dan didapatkan hasil bahwa harga IC 50 fraksi tersebut adalah 1,70 µg/ml.
 7. Ekasari W., Aty W., Suhintam P. (2002), menguji dan membandingkan daya skinzontosida ekstrak etanol, ekstrak kloroform dan fraksi alkaloid total daun *C. siamea* yang didapat dengan mengikuti tahapan isolasi untuk senyawa alkaloid, pada biakan *in vitro* *P. falciparum*. Didapatkan hasil bahwa harga IC₅₀ semakin menurun (semakin potensial) seiring dengan makin murninya bahan yaitu : IC₅₀

- ekstrak etanol sebesar 7,06 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak kloroform = 2,41 $\mu\text{g/ml}$ dan fraksi alkaloid total sebesar 1,70 $\mu\text{g/ml}$.
8. Ekasari W. dan Aty W. (2004), telah melakukan uji pendahuluan secara *in vivo* dari ekstrak etanol daun *C. siamea* pada mencit terinfeksi *P. berghei*. Didapatkan hasil bahwa harga ED_{50} dari ekstrak etanol sebesar 8,43 mg/ml.
 9. Ekasari W., Aty W., Suhintam P. (2004), telah menguji perbandingan daya hambat ekstrak etanol, ekstrak kloroform dan fraksi alkaloid total daun *C. siamea* terhadap *P. berghei* secara *in vivo*. Didapatkan hasil bahwa harga ED_{50} semakin menurun (semakin potensial) seiring dengan makin murninya bahan yaitu: ED_{50} ekstrak etanol sebesar 34,69 mg/KgBB, ekstrak kloroform = 19,59 mg/KgBB dan fraksi alkaloid total sebesar 0,47 mg/KgBB.
 10. Ekasari W., Aty W., Indah T. (2005), telah menguji antimalaria hasil fraksinasi ekstrak kloroform daun *C. siamea* pada mencit terinfeksi *P. berghei*. Didapatkan hasil Fraksi I = 0,58798 mg/kg BB, Fraksi II = 8,43313 mg/kg BB, Fraksi III = 6,93726 mg/KgBB, Fraksi IV = 16,5014 mg/KgBB dan Fraksi V (positif alkaloid) = 0,25288 mg/KgBB.
 11. Ekasari W. *et al.* (2005-2006), telah melakukan penelitian dengan hasil terpilihnya fraksi etilasetat daun Johar sebagai bahan baku fitofarmaka antimalaria dengan hasil aktivitas fraksi etil asetat daun johar (*C. siamea*) secara *in vitro* pada *P. falciparum*: 1,93 $\mu\text{g/ml}$ dan *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* sebesar: 3,803 mg/KgBB. Dosis efektif fraksi ini didapat pada 42 mg/KgBB dengan pemberian 3 kali sehari selama 4 hari. Selanjutnya telah pula diuji keamanannya dengan meneliti toksisitas akut dan kronisnya dan didapatkan

hasil toksisitas akutnya 16,57 g/KgBB dan dari uji toksisitas kronis diketahui pemberian fraksi etil asetat daun Johar dengan dosis 1, 5 dan 10 kali dosis lazim, sekali setiap hari selama 30 hari tidak berpengaruh pada histopatologi hati dan ginjal tikus dan tidak mempengaruhi kadar SGOT, SGPT, glukosa dan protein total hewan coba.

2.3 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam

Kata “ekstraksi” berasal dari bahasa Latin “*extractio* atau *extrahere*” yang berarti menarik keluar. Yang ditarik keluar adalah senyawa-senyawa kimia dari tumbuhan dan atau hewan. Cara menarik keluar senyawa-senyawa tersebut dapat dilakukan dengan cara penyarian, diperas atau destilasi. Bahan baku alami berupa tumbuhan atau hewan biasanya susunannya kompleks dan tidak tunggal. Bahan aktifnya sendiri ada yang larut dalam satu atau lebih pelarut, sehingga dalam pengerjaannya harus selalu dipertimbangkan pemilihan pelarut yang tepat atau menstruum yang dapat melarutkan dan menarik keluar bahan aktif tersebut.

Pada umumnya pelarut yang digunakan adalah pelarut yang kurang polar sedikit demi sedikit meningkat sampai dengan yang paling polar. Pelarut non polar yang sering dipakai misalnya petroleum 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).

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 dari 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, memperkolasi melalui celah-celah fase diam. Gerakan fase gerak akan menyebabkan perbedaan migrasi dari penyusun cuplikan (Stahl, 1985).

2.3.1.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah tehnik 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 juga sering digunakan untuk mencari pelarut pada kromatografi kolom, menganalisis hasil kromatografi kolom, identifikasi dan isolasi suatu senyawa pada skala kecil.

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, 1988).

2.4 Tinjauan tentang Spektroskopi

2.4.1 Spektroskopi Infra Merah

Spektrometri inframerah merupakan salah satu alat yang penting dalam penentuan struktur senyawa organik. Spektrum inframerah memberikan gambaran mengenai gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam suatu molekul.

Inti-inti atom yang terikat oleh ikatan kovalen mengalami getaran atau vibrasi. Jika molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan amplitudo vibrasi atom-atom yang terikat itu. Jadi molekul tersebut berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi. Ikatan antara dua atom dapat mengalami vibrasi ulur atau vibrasi tekuk. Setiap ikatan memerlukan energi tertentu agar berpindah ke keadaan vibrasi tekuk tereksitasi dan sejumlah energi tertentu untuk berpindah ke keadaan vibrasi ulur tereksitasi. Dengan kata lain suatu ikatan akan menyerap energi dengan panjang gelombang tertentu.

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, 1998).

2.4.2. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Spektrometri resonansi magnetik inti (RMI) didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik apabila molekul tersebut berada dalam medan magnet yang kuat. Spektrum RMI memberikan gambaran mengenai atom-atom terutama atom hidrogen dalam sebuah molekul.

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.

Bila 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 antiparalel. Bila dikenai gelombang radio yang frekuensinya sesuai, proton paralel akan menyerap energi dan membalik menjadi keadaan antiparalel. Proton tersebut dikatakan berada dalam keadaan resonansi. Besarnya energi yang diperlukan untuk beresonansi sebanding dengan besarnya H_0 .

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, 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 NaHCO₃. Larutan disterilkan dengan saringan diameter 0,45µm 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 IC_{50} 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 Uji Aktivitas Antimalaria secara *in vivo*

Untuk pengujian antimalaria secara *in vivo* dengan menggunakan *P. berghei* digunakan metode Tes Peter (*The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*). Mencit jantan (misal: Swiss albino) dengan berat sekitar 20 ± 2 gram ditempatkan pada ruang bersuhu $22^{\circ}C (\pm 2^{\circ}C)$ dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok serta diberi makan dengan menu standar. Darah yang berasal dari mencit donor dengan kandungan parasitemia yang sudah tinggi (sekitar 20% eritrosit yang terinfeksi) dilarutkan dalam jaringan media kultur (TC 199) sampai tiap 0,2 ml mengandung 10^7 eritrosit yang terinfeksi.

Ekstrak tanaman dapat dilarutkan atau dibuat suspensi dengan cara triturasasi atau sonifikasi setelah penambahan 0,2% larutan tween atau 0,5% larutan CMC atau DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan perhari dengan rentang dosis 1 – 10 mg/KgBB dimulai sejak hari penginfeksi selama 4 hari berturut-turut melalui rute subkutan atau oral. Dan pada hari kelima, dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor dan dilakukan pewarnaan dengan menggunakan pewarna yang sesuai (misal: giemsa) kemudian dilakukan perhitungan prosentase dari jumlah eritrosit yang mengandung parasit terhadap jumlah total eritrosit.

Harga ED_{50} (adanya kemampuan penekanan dari jumlah parasit sebanyak 50% ketika dibandingkan dengan kontrol) dapat dihitung dari harga log dosis terhadap aktivitas

probit. Standar deviasi dapat dihitung dengan menggunakan program komputer yang sesuai. Untuk pengamatan skala besar, pada satu dosis (misal: 1000 mg/Kg) dapat diberikan secara berseri.

2.7 Degradasi Hemoglobin dalam Vakuola Makanan

Sejak 48 jam invasi *Plasmodium* ke dalam eritrosit, terjadi degradasi hemoglobin sekitar 80% dari sel induk diuraikan menjadi asam amino, sebagian digunakan untuk sintesa protein parasit. Proses biogenesis degradasi hemoglobin diawali dengan pembentukan formasi double-membran pada transport vesikel (*transport vesicle*) oleh sitostom sel host secara pinositosis yaitu bagian dalam (*inner*) merupakan membran plasma parasit (*parasite plasma membrane*) dan bagian luar (*outer*) dari vesikel transport adalah *parasitophorous vacuolar membrane (PVM)*. Selanjutnya hemoglobin diangkut transport vesikel ke vakuola makanan sebagai suatu "organel seperti lisosom" (*lysosome-like organelle*) yang kaya oksigen dan mengalami fusi dalam vakuola makanan parasit malaria. Di dalam vakuola makanan beberapa enzim protease berperan pada hidrolisis hemoglobin menjadi fragmen peptida kecil, dan ini merupakan target obat-obat antimalaria (Hempelmann *et al.*, 2003; Rathore *et al.*, 2006).

Vakuola makanan *Plasmodium* memiliki kurang lebih tiga jenis enzim protease yaitu aspartik protease (Plasmepsin), sistein protease (falcipain) dan metallo protease (falsilysin). Ketiga enzim ini terlibat dalam proses hidrolisis hemoglobin menjadi globin yang selanjutnya menjadi peptida (oligo peptidase) dan heme. Proses inisiasi pemecahan hemoglobin oleh plasmepsin I dan diduga juga peran falsipain-2 menjadi hemoglobin tetramer. Selanjutnya falcipain yang dikode oleh 4 genom yang berbeda akan melanjutkan pemecahan pada bagian yang lain dari protein. Falcipain-2 dan falsipain-3,

66,6-93% teridentifikasi pada daerah kataliknya di vakuola makanan *P. falciparum* pada stadium parasit yang berbeda dan aktif pada pH asam. Falcipain-2 terekspresi pada trophozoit awal sedangkan falcipain-3 terekspresi pada trophozoit akhir (fase yang lebih dewasa). Falcipain mengubah oligo peptida menjadi peptida kecil tersebut yang selanjutnya menjadi 20 asam amino oleh aminopeptidase. Proses proteolitik maksimal terjadi pada fase trophozoit diikuti dengan shizont dan cincin (Sherman, 1998; Banerjee *et al.*, 2002; Ridley, 2002; Wiser, 2003; Sijwali *et al.*, 2004).

Beberapa peneliti lain juga mengemukakan hal yang sama yaitu pada *P. falciparum*, sistein protease yaitu falcipain-2 dan falcipain-3 berperan dalam hidrolisis hemoglobin intraeritrositik parasit malaria. Falcipain-2 akan lebih aktif dalam pemecahan peptida-peptida kecil, sedangkan peran falcipain-1 belum diketahui dengan jelas. Falcipain-2 memecahkan hemoglobin host pada pH asam. Aktivitas falcipain-2 menunjukkan aktivitas maksimum pada fase awal dan fase akhir trophozoit (Olliaro *et al.*, 1995; Hanspal *et al.*, 2001; Shenai *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Blackman, 2004; Tekwani *et al.*, 2005).

Proses hidrolisis hemoglobin yang berperan penting dalam siklus hidup parasit malaria sebagai sumber nutrisi, dikendalikan oleh enzim sistein protease. Sistein protease dikatakan sebagai patogen utama bagi manusia sehingga dijadikan target dalam kemoterapi. Inhibitor terhadap sistein protease akan menyebabkan proses penguraian hemoglobin menjadi terganggu dan asam amino tidak terbentuk (Na *et al.*, 2004).

Beberapa inhibitor pada proses degradasi hemoglobin dapat menyebabkan proses tersebut menjadi terganggu. Secara morfologi hambatan inhibitor pada proses degradasi hemoglobin menyebabkan pembengkakan pada vakuola makanan dan vakuola makanan berwarna gelap. Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE terhadap akumulasi globin dapat

ditunjukkan dengan adanya pita yang berwarna hitam pada posisi 16 kDa (Rosenthal *et al*, 1991; Sherman *et al* , 1998).

2.8 Detoksifikasi Heme Parasit Malaria

Menurut Bozdech (2003), saat pecahnya merozoit terjadi invasi pada sel-sel eritrosit menjadi stadium ring mulai terbentuklah *parasitophorous vacuola (PV)*. Parasit kemudian mengalami maturasi dengan replikasi menjadi trophozoit. Selanjutnya stadium shizont, sel-sel mulai mempersiapkan terjadinya reinvasi ke eritrosit baru dengan mengadakan replikasi membentuk sekitar 32 merozoit baru.

Parasit malaria pada fase eritrositik terletak di dalam lingkungan intraseluler yang melindungi mereka dari serangan imunologik. Tetapi kondisi ini juga memisahkan mereka dari suplai nutrisi yang terdapat dalam sirkulasi darah. Oleh karena itu parasit mengembangkan mekanisme baru untuk membawa dan mendapatkan nutrisi dari sitosol eritrosit. Pada fase intraeritrosit ini *Plasmodium* menggunakan eritrosit sebagai sumber nutrient yang dapat dikonsumsi dengan cepat dalam waktu singkat. Hemoglobin dari sitosol eritrosit dibawa ke dalam vakuola makanan dan akan didegradasi secara proteolitik. Degradasi hemoglobin merupakan suatu proses metabolisme sebagai sentral pertumbuhan dan maturasi parasit malaria (Banerjee, 2002).

Sumber-sumber asam amino untuk kebutuhan parasit diperoleh dengan proses mencernakan hemoglobin host dan *up take* asam amino bebas. Eritrosit dari sitosol dibawa masuk ke dalam vakuola makanan yang bersifat asam (*acidic food vacuole*) dan selanjutnya akan dipecah menjadi globin dan heme. Globin akan dihidrolisis menjadi asam-asam amino bebas (*free amino acid*) yang digunakan untuk proses sintesis protein parasit. Hemoglobin menyediakan sebagian besar dari asam amino yang dibutuhkan

parasit untuk melangsungkan proses sintesis protein. Hemoglobin juga menyediakan kebutuhan besi (Fe) untuk parasit. Proses pemecahan hemoglobin dalam jumlah besar menimbulkan konsekuensi bagi parasit karena akan menghasilkan heme bebas yang bersifat toksik dalam konsentrasi yang signifikan. Karena itu parasit harus mengubahnya menjadi pigmen hemozoin yang tidak toksik. Tahap-tahap awal degradasi hemoglobin oleh parasit malaria belum diketahui secara jelas (Gamboa and Rosenthal 1996; Sherman, 1998; Wiser, 2001).

Proses hidrolisis hemoglobin yang berperan penting dalam siklus hidup parasit malaria sebagai sumber nutrisi, dikendalikan oleh enzim sistein protease. Sistein protease dikatakan sebagai patogen utama bagi manusia sehingga dijadikan target dalam kemoterapi. Inhibitor terhadap sistein protease akan menyebabkan proses penguraian hemoglobin menjadi terganggu dan asam amino tidak terbentuk (Na *et al*, 2004).

Proses pengambilan dan penguraian hemoglobin dari eritrosit yang terinfeksi parasit menimbulkan konsekuensi yang merugikan bagi parasit. Hemoglobin yang mengalami proteolisis akan menghasilkan asam amino dan juga heme bebas (Fe(III)PPIX). Dalam kaitan ini terjadilah keseimbangan pembentukan asam amino dan mencegah efek heme bebas. Heme bebas bersifat toksik bagi parasit dan mempunyai kemampuan untuk melisis membran parasit malaria serta dapat menghambat aktivitas beberapa enzim. Oleh karena itu parasit malaria mengembangkan mekanisme detoksifikasi heme. Mekanisme detoksifikasi heme yang telah teridentifikasi yaitu: 1) Mengubah heme bebas menjadi hemozoin atau pigment malaria, secara spontan (biokristalisasi), 2) Degradasi yang difasilitasi oleh hidrogen peroksida di dalam vakuola makanan, 3) Degradasi glutathione-dependent yang terjadi dalam sitoplasma parasit, 4) Kemungkinan terjadi oksigenasi heme

ditemukan pada *P. berghei* (parasit rodent) dan *P. knowlesi* (parasit simian) tetapi tidak terjadi pada *P. falciparum*. Detoksifikasi heme menjadi hemozoin sebagai suatu proses biokristalisasi merupakan mekanisme utama (*major mekanisme*) yang terjadi pada parasit malaria (Sherman, 1998; Ziegler, 2001; Tekwani, 2005). Proses ini merupakan target penting pengembangan obat antimalaria (Fidock, 2004).

Analisis dengan spektroskopik dan kristalografi X-ray mengindikasikan bahwa struktur hemozoin sama dengan β -hematin. β -hematin merupakan bentuk dimer dari heme dengan ikatan kovalen reciprocal antara kelompok asam karbosilik pada cincin protoporphyrin-IX dan atom-atom Fe (Wiser, 2004; Rathore, 2006). Bentuk-bentuk dimer tersebut berinteraksi secara langsung dengan ikatan hidrogen membentuk kristal hemozoin sehingga formasi pigmen dideskripsikan sebagai suatu proses biokristalisasi atau biomineralisasi (Hempelmann, 2002; Wiser, 2004). Mekanisme pembentukan formasi hemozoin belum banyak diketahui, tetapi *histine-rich protein 2 (PfHRP2)* parasit malaria dan lipid-lipid diduga ikut terlibat sebagai inisiator dalam proses polimerisasi heme tersebut. *Histine-rich protein 2 (PfHRP2) P. falciparum* merupakan inisiator pada proses polimerisasi heme dan produk degradasi hemoglobin dan promotor pada degradasi heme yang menghasilkan H_2O_2 pada vakuola makanan parasit malaria (Wiser, 2004; Rathore, 2006).

Selanjutnya bentuk ferro (Fe^{2+} -PPIX) dalam vakuola makanan dengan pelepasan elektron berubah menjadi bentuk ferri (Fe^{3+} -PPIX) menghasilkan anion superoksida yang akan diprotek oleh enzim-enzim antioksidan seperti superoksida dimustase dan glutathion reduktase pada sitosol parasit malaria (Wiser, 2003).

Menurut Wisner, (2004) proses sintesis hemozoin dan proses degradasi hemoglobin berlangsung secara simultan dengan mengkonversi 25-50% heme bebas menjadi hemozoin. Selanjutnya dijelaskan juga bahwa lebih dari 95% besi (Fe) bebas dihasilkan sejak pengambilan hemoglobin ditemukan dalam hemozoin. Menurut Rathore *et al.*, (2006) proses detoksifikasi heme dilakukan dengan pengambilan hemoglobin melalui invaginasi sitostomal secara pinositosis dari sitosol host. Transpor vesikel kemudian mentransfer hemoglobin ke vakuola makanan.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN PENELITIAN

3.1.1. Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa bioaktif daun *C. siamea* dan mengetahui mekanisme aksinya pada parasit malaria.

3.1.2. Tujuan Khusus

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa alkaloid daun *C. siamea*.
2. Menguji aktivitas antimalaria senyawa alkaloid hasil isolasi daun *C. siamea* terhadap *P. falciparum* sensitive dan resisten klorokuin secara *in vitro*.
3. Menguji aktivitas antimalaria senyawa aktif antimalaria hasil isolasi daun *C. siamea* terhadap *P. berghei* secara *in vivo*.
4. Menguji efek senyawa aktif antimalaria hasil isolasi daun *C. siamea* pada proses degradasi hemoglobin parasit malaria.
5. Menguji efek senyawa aktif antimalaria hasil isolasi daun *C. siamea* pada proses detoksifikasi heme parasit malaria.

3.2. MANFAAT PENELITIAN

3.2.1 Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang:

1. Struktur senyawa hasil isolasi daun *C. siamea*.

2. Aktivitas antimalaria senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* terhadap *P. falciparum* galur sensitif dan resisten klorokuin secara *in vitro* dan *P. berghei* secara *in vivo*.
3. Target biokimiawi pada parasit malaria yang potensial untuk dijadikan sebagai dasar pengembangan obat antimalaria.

3.2.2 Manfaat praktis

1. Mendapatkan bahan dasar obat antimalaria dengan target biokimiawi yang jelas.
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

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, dan di Laboratorium Farmacognosy Hoshi University, Jepang.

Pembiakan parasit malaria dan pengujian aktivitas hambatan pertumbuhan parasit malaria *P. falciparum* strain 3D7 *in vitro* dan *P. berghei* strain ANKA *in vivo* 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 2009 sampai dengan bulan Oktober tahun 2009.

4.3 Prosedur Pengambilan/Pengumpulan Data

4.3.1 Persiapan Sampel Penelitian

4.3.1.1 Isolasi Daun *C. siamea* Lamk

Serbuk daun *C. siamea* Lamk dimaserasi dengan metanol kemudian hasil ekstraksi diuapkan dengan rotavapour. Ekstrak selanjutnya dilarutkan kembali dengan 50 ml metanol dan diekstraksi kembali dengan etil asetat asam tartarat 3% sebanyak 3 kali. Lapisan air dibasakan dengan Na_2CO_3 sampai pH 9-10 kemudian diekstraksi kembali dengan kloroform sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi dipekatkan sehingga didapatkan hasil ekstrak kloroform. Dilakukan kromatografi kolom terhadap ekstrak kloroform dengan menggunakan silika gel dengan rangkaian fase gerak sebagai berikut: CHCl_3 100% , CHCl_3 : MeOH (40:1), CHCl_3 : MeOH (20:10), CHCl_3 : MeOH (9:1), CHCl_3 : MeOH (8:2) dan CHCl_3 : MeOH (1:1), kemudian terakhir dengan metanol 100%. Hasil fraksinasi selanjutnya dilakukan pemisahan lagi menggunakan kromatografi kolom dengan silika gel dengan rangkaian fase gerak sebagai berikut: CHCl_3 100 % , CHCl_3 : MeOH (40:1), CHCl_3 : MeOH (30:10), CHCl_3 : MeOH (20:10), CHCl_3 : MeOH (15:1) dan terakhir dengan metanol 100%. Isolat-isolat yang didapat selanjutnya dilakukan pemurnian dan diidentifikasi untuk menentukan strukturnya.

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 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.

4.3.3.2 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.

4.3.3.3 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*.

4.3.3.4 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.

4.3.3.5 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:

- a. 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.
- b. Kultur disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dibuang.

- c. 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
- d. Setelah endapan dicuci, ditambahkan medium lengkap dan eritrosit 50% dicampur perlahan menggunakan pipet (sampai diperoleh hematokrit 10%).
- e. Kultur dipindahkan ke dalam cawan petri, dimasukkan dalam *candle jar* dan selanjutnya disimpan di dalam inkubator yang bersuhu 37°C.
- f. Selanjutnya dilakukan penggantian medium setiap hari. Bila tingkat parasitemianya lebih dari 5% dapat dilakukan sub biakan.

4.3.3.6 Penyiapan Bahan Uji

Sebagai bahan uji adalah senyawa yang dihasilkan dalam proses isolasi daun *C. siamea*. Ditimbang isolat sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dalam 100 μ l DMSO. Larutan ini merupakan larutan stok bahan uji. Penyiapan bahan uji ini dikerjakan pada kondisi aseptis.

4.3.3.7 Prosedur Pengujian

- a. Diambil 10 μ l larutan stok bahan uji dan ditambahkan medium lengkap sampai dengan 500 μ l.
- b. 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.

- c. Sebanyak 100 μ l suspensi parasit dengan kadar parasitemia 1% dan hematokrit 5% ditambahkan kedalam tiap-tiap sumur mikrotiter tersebut. Kemudian diinkubasi didalam *candle jar* selama 48 jam pada suhu 37 °C.

4.3.3.8 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 parsitemia 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

4.3.3.9 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 Aktivitas Antimalaria *in vivo*

Senyawa yang paling aktif menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro* selanjutnya diuji aktifitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. berghei* secara *in vivo* pada hewan coba mencit.

4.3.4.1 Penyiapan *P.berghei* untuk Penginfeksi Mencit Donor

Penginfeksi mencit donor dilakukan dengan menggunakan simpanan beku darah yang telah terinfeksi *P. berghei* dalam medium alceiver (1:3). Setelah suhunya telah sesuai dengan suhu kamar sediaan tersebut diinjeksikan secara intraperonial pada mencit sebanyak 100-200 μ l. Bila persen parasitemia telah mencukupi kemudian dilakukan pengambilan darah untuk penginfeksi pada mencit coba.

4.3.4.2 Penyiapan *P. berghei* untuk Penginfeksi Mencit Coba

Mencit yang akan digunakan dalam pengujian ekstrak dibagi atas 5 kelompok masing-masing terdiri dari 9 mencit, yaitu 4 kelompok coba dan 1 kelompok kontrol (negatif). Sebelum dilakukan pengujian mencit tersebut harus diinfeksi terlebih dahulu sebanyak 100-200 μ l secara intraperitonial. Kemudian ditunggu dan diamati setiap hari persen parasitemianya. Bila persen parasit telah mencapai 1-5% maka uji aktivitas antimalaria dapat dimulai.

4.3.4.3 Prosedure Uji Aktivitas Antimalaria *in vivo*

Seluruh mencit yang digunakan dalam penelitian telah mencapai tingkat parasitemia antara 1-5% maka pengujian aktivitas antimalaria dapat dimulai. Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor mencit untuk dihitung jumlah parasitemianya. Bahan uji yang terdiri dari bermacam-

macam dosis disiapkan. Pada pengujian, masing-masing kelompok akan mendapatkan larutan uji sesuai dengan dosis yang ditentukan. Pemberian larutan senyawa hasil isolasi dari daun johar *C. siamea* secara i.p. dilakukan pada hari ke-0 (D0) sampai hari ke-3 (D3). Pengambilan sampel darah dari ekor mencit dilakukan setiap hari sebelum mencit diberi perlakuan dan dibuat hapusan tipis untuk mengamati perkembangan aksi obat.

4.3.4.4. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis probit yang digunakan untuk menghitung ED_{50} (Efektif Dose : dosis senyawa hasil isolasi dari daun johar yang mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei* sebesar 50%) dengan membuat kurva hubungan antara probit (*probability unit*) prosentase penghambatan dengan logaritma kadar.

4.3.5. Uji Hambatan Degradasi Hemoglobin (Pandey *et al*, 1999)

Uji hambatan degradasi hemoglobin dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Hewan uji terinfeksi *P. berghei* strain ANKA dengan parasitemia lebih dari 20% dikumpulkan darahnya dalam tabung berisi antikoagulan ACD steril (1:1) dan disentrifus selama 2 menit pada 2000 rpm.
- b. Cuci dengan medium tak lengkap (*incomplete medium*) dan sentrifuse pada 2000 rpm selama 2 menit (dua kali pencucian).
- c. Tambahkan medium komplit yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak volume yang didapatkan (*equal volume*).
- d. Sel darah merah terinfeksi parasit (IRBC) ditambahkan pada multititer plate yang mengandung senyawa uji sesuai dosis yang dibutuhkan (10 $\mu\text{g/ml}$).
- e. Selanjutnya untuk pengamatan 0 jam, kultur parasit langsung dipanen.

- f. Inkubasi dilakukan selama 0- 6 jam pada cawan mikrotiter datar yang berisi 24 sumur (*well*) pada suhu 37⁰ C.
- g. Setelah inkubasi kultur dikumpulkan dan disentrifus untuk memisahkannya dengan medium pada 2000 rpm selama 2 menit.
- h. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS 1 ml pada 2000 rpm, selama 2 menit dan supernatan dibuang.
- i. Tambahkan saponin 0,5 % dalam PBS sebanyak 1 ml (tetap di dalam es) dan disimpan di dalam es selama 5 menit. Sentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatant dibuang.
- j. Pelet yang didapatkan ditambahkan protease inhibitor kombinasi (*protease cock tail*) atau 15 µl PMSF (*Phenylmethylsufoniflouride*). Inkubasi dilakukan selama 10 -20 menit dalam es.
- k. Sentrifuse pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil untuk di lakukan pengukuran konsentrasi protein dengan Bradford.
- l. Kultur kemudian disentrifus 10 menit, 1200 rpm (Sorvall MC 12V Dupont). Pelet kemudian ditambahkan dapar sampel SDS-PAGE dan dididihkan selama 3 menit.
- m. Kemudian disimpan pada suhu -20 °C sebelum pengujian selanjutnya.
- n. Elektroferesis dilakukan dengan poliakrilamid 15% (kondisi *reducing*) dengan low marker protein sebagai penanda bobot molekul dan diidentifikasi dengan pewarna perak nitrat dengan merendam gel dalam larutan pewarna pada temperatur kamar.
- o. Penghilangan pewarna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan destaining sampai gel menjadi jernih.

- p. Hasil elektroforesis kemudian difoto. Posisi monomer globin yang tidak didegradasi oleh parasit, pada gel akan terlihat sebagai pita yang jelas pada perlakuan sedangkan posisi yang sama dari kontrol negatif yang dihidrolisis tidak ditemukan pita globin.

4.3.6. Uji Hambatan Detoksifikasi Heme dengan Pengamatan Morfologi Menggunakan Mikroskop Elektron Transmisi (Aikawa, 1971; Bozzola and Russell, 1998)

Pengujian efek senyawa aktif terhadap biakan *P. falciparum* dengan melihat perubahan morfologi karena adanya hambatan degradasi hemoglobin dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

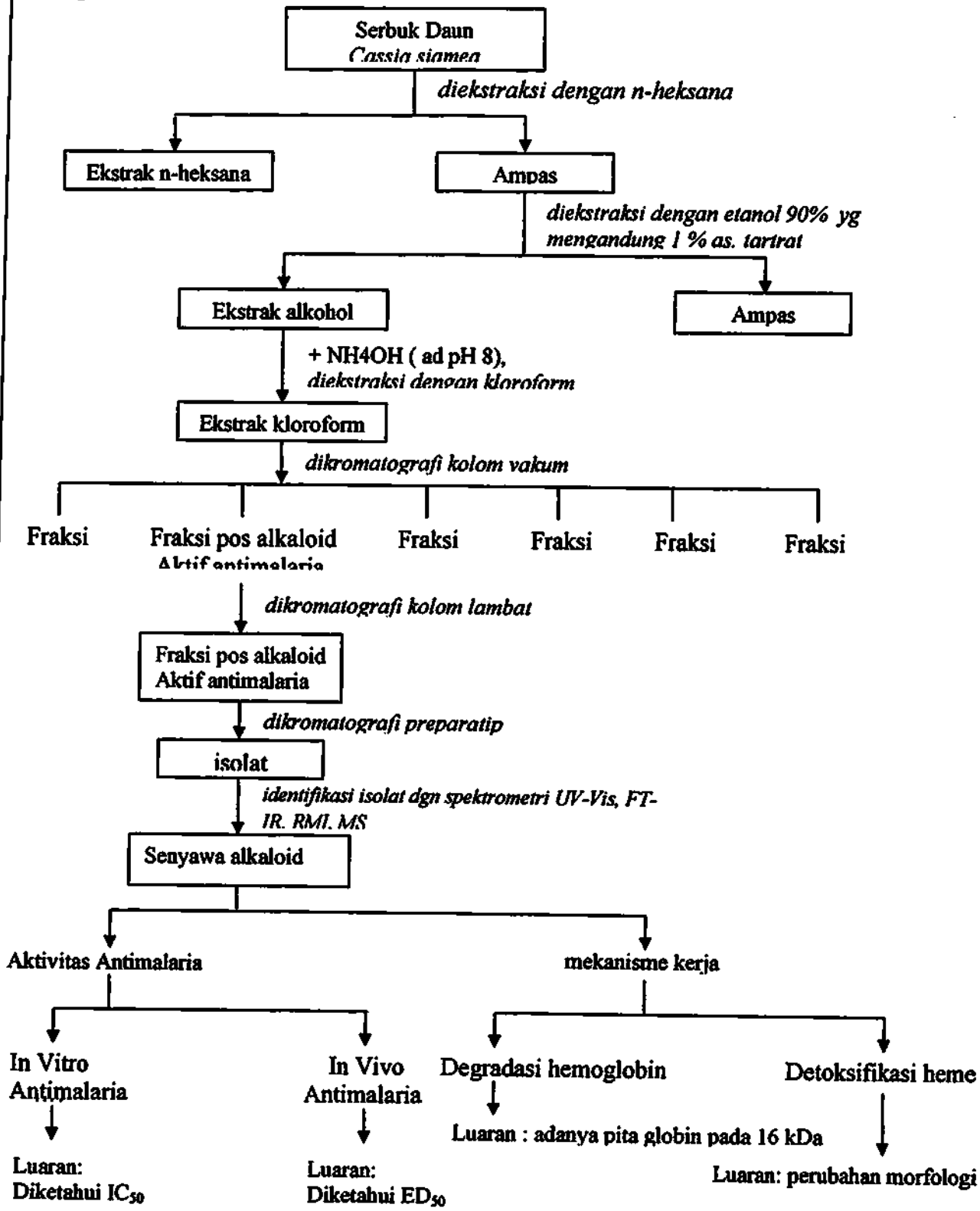
- a. Kultur *P.falciparum* stadium trophozoit awal diinkubasi dengan senyawa aktif (konsentrasi akhir 10 μ g/ml) dengan parasitemia kurang lebih 1% dan 5% hematokrit.
- b. Kultur parasit dipanen 100 μ l pada jam ke 12 dan 24 pada masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan dengan dapar sodium cacodilat pH 7.4 sebanyak 500 μ l disentrifus pada 3000 rpm selama 3 menit, untuk memisahkan jaringan dengan medium (lakukan dalam keadaan dingin).
- c. Filtrat dibuang kemudian ditambahkan lagi dengan dapar sodium cacodilat pH 7.4 sebanyak 500 μ l disentrifus pada 3000 rpm selama 3 menit, dan filtrat dibuang.
- d. Pellet yang didapat kemudian difiksasi dengan glutaraldehid 5% yang mengandung dapar cacodilat pH 7.4 dan sukrosa 3% selama 24 jam (simpan pada suhu 4 °C).
- e. Setelah 24 jam, dibilas dengan dapar natrium cacodilat 0.1 M pH 7,4 selama 15 menit sebanyak 3 kali pada suhu 4 °C.

- f. Selanjutnya fiksasi akhir menggunakan osmium tetraoksida 2% dan kalium ferrisianida $K_3Fe(CN)_6$ dalam dapar cacodilat 0.1M yang mengandung sukrosa 3% selama 2 jam pada suhu 4 °C, setelah itu dicuci kembali dengan dapar selama 15 menit sebanyak 3 kali.
- g. 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.
- h. 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.
- i. 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 *noneryl succinic anhydrate (NSA)*, 0,4 g *dimethylaminoethanol/ (DMAE)* dengan perbandingan 1:1 pada suhu ruang selama 30 menit.
- j. 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.
- k. 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.

- i. Setelah itu, sebagian bahan plastik pada permukaan blok dibuang agar jaringan yang akan diperiksa berada tepat di permukaan, kemudian pada permukaan blok dibuat bentuk trapezium.
- m. 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*.
- n. 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*.
- o. Hasil potongan diwarnai dengan uranil asetat, dilanjutkan *triple lead* kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi JEOL 1010.
- p. Morfologi vakuola makanan parasit *P. falciparum* dalam eritrosit yang telah diberi senyawa uji diamati dan dibandingkan dengan morfologi vakuola makanan *P. falciparum* kontrol negatif (tanpa pemberian senyawa uji).

Bagan Alir Penelitian



Gambar 4.1 Bagan alir penelitian

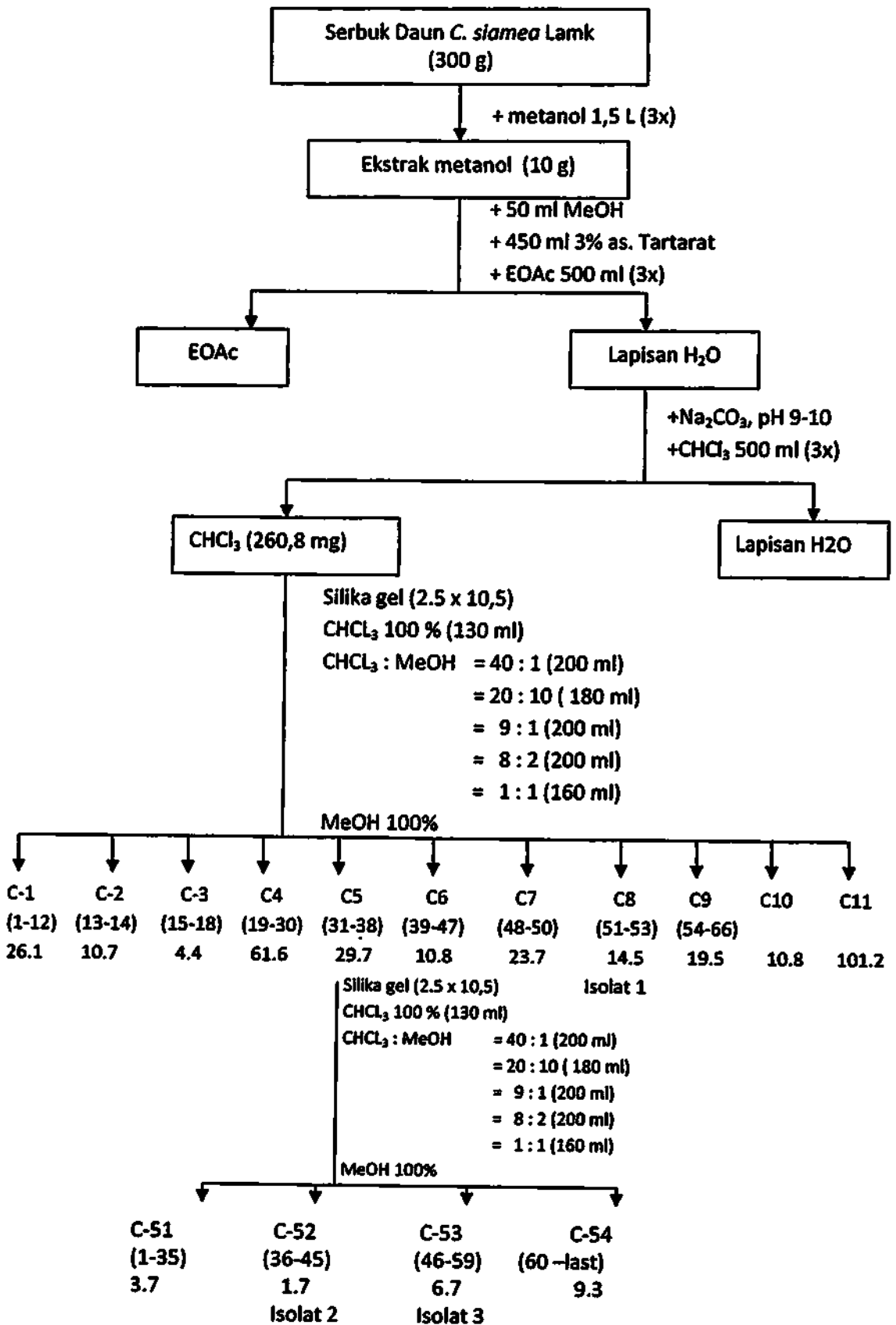
BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Isolasi Daun *C. siamea* Lamk

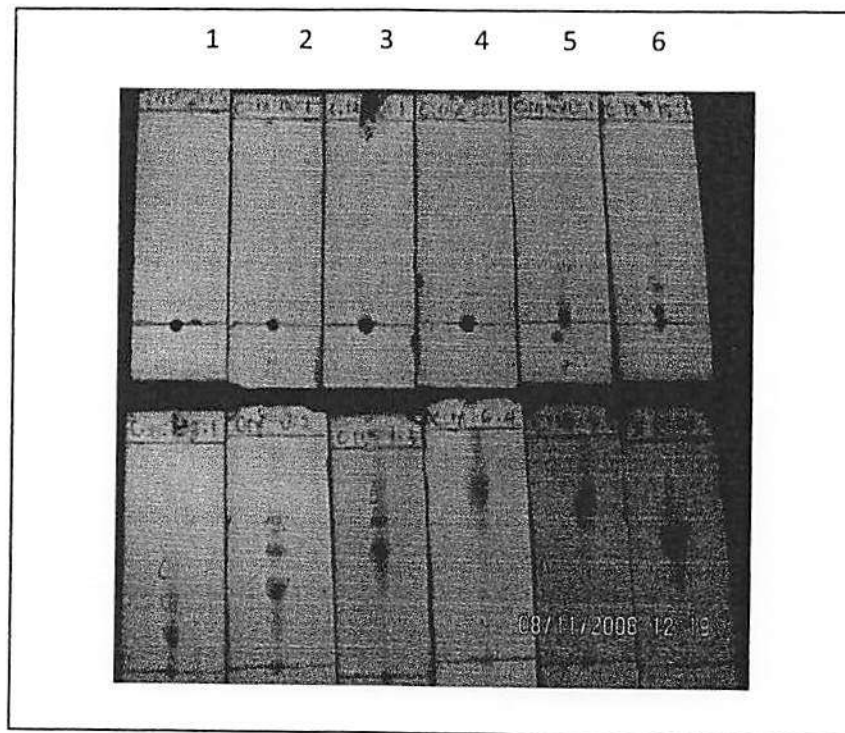
Serbuk daun *C. siamea* Lamk sebanyak 300 g dimaserasi dengan metanol sebanyak 1500 ml dan didapat hasil ekstrak metanol pekat sebanyak 10 g. Selanjutnya dilarutkan kembali dengan 50 ml metanol dan diekstraksi dengan etil asetat 500 ml dan 450 ml asam tartarat 3% sebanyak 3 kali. Lapisan air dibasakan dengan Na_2CO_3 sampai pH 9-10 kemudian diekstraksi kembali dengan kloroform 500 ml sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi dipekatkan sehingga didapatkan hasil ekstrak kloroform sebanyak 260,8 mg. Kemudian dilakukan kromatografi kolom terhadap ekstrak kloroform dengan menggunakan silika gel dengan rangkaian fase gerak sebagai berikut: CHCl_3 100% (130 ml), CHCl_3 : MeOH (40:1) 200 ml, CHCl_3 : MeOH (20:10) 180 ml, CHCl_3 : MeOH (9:1) 200 ml, CHCl_3 : MeOH (8:2) 200 ml dan CHCl_3 : MeOH (1:1) 200 ml, kemudian terakhir dengan metanol 100%. Fraksinasi ini menghasilkan 11 fraksi, yang mana pada fraksi C8 (51-53) menghasilkan isolat 1 sebanyak 14.5 mg (0.005%).

Fraksi C5 (31-38) sebanyak 29,7 mg dilanjutkan untuk dilakukan kromatografi kolom dengan menggunakan silika gel dengan rangkaian fase gerak sebagai berikut: CHCl_3 100% (200 ml), CHCl_3 : MeOH (40:1) 120 ml, CHCl_3 : MeOH (30:10) 120 ml, CHCl_3 : MeOH (20:10) 100 ml, CHCl_3 : MeOH (15:1) 100 ml dan terakhir dengan metanol 100%. Isolasi ini menghasilkan 4 fraksi, Fraksi C-5.2.(36-45) menghasilkan isolat 2 sebanyak 1.7 mg dan fraksi C-5.3 (46-59) menghasilkan isolat 3 sebanyak 6,7 mg. Skema hasil isolasi dari daun *C. siamea* Lamk dan kromatogram hasil KLT dapat dilihat berikut ini.



Gambar 5.1 Skema isolasi isolat 1, isolat 2 dan isolat 3 dari daun *C. siamea*

Berikut adalah hasil dari pemilihan fase gerak terhadap ekstrak kloroform daun *C. siamea* Lamk agar didapatkan pemisahan terbaik menggunakan plate KLT.

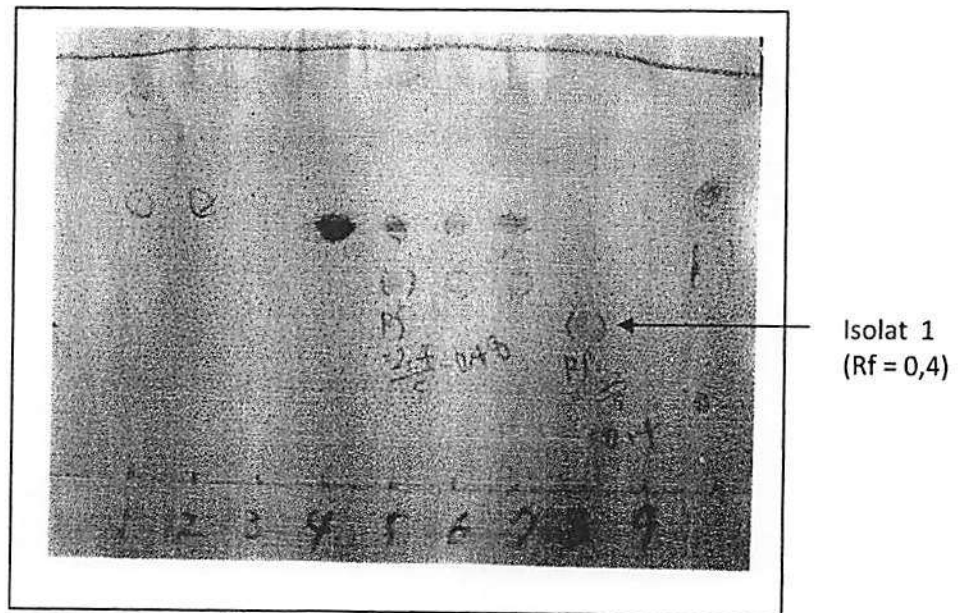


Gambar 5.2 Kromatogram hasil KLT dari ekstrak kloroform daun *C. siamea* Lamk dengan bermacam-macam fase gerak menggunakan penampak noda Dragendorff

Keterangan :

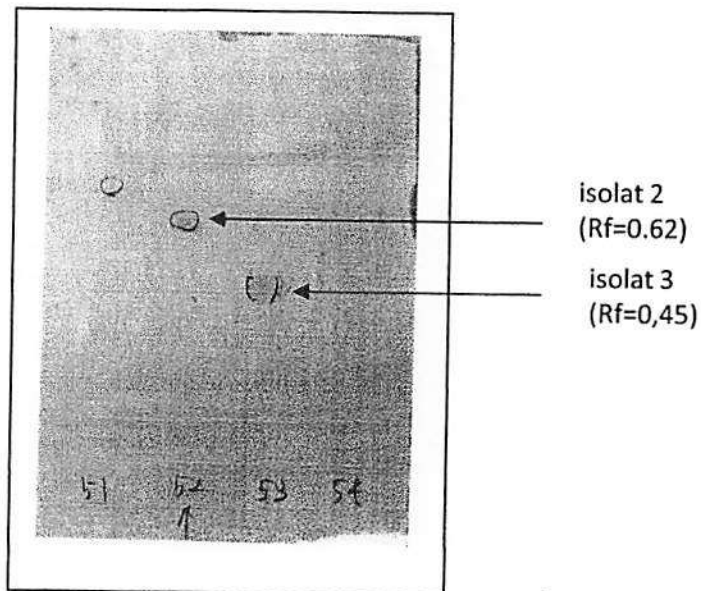
- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. CHCl_3 -MeOH (100 : 0) | 7. CHCl_3 -MeOH (9 : 1) |
| 2. CHCl_3 -MeOH (80 : 1) | 8. CHCl_3 -MeOH (8 : 2) |
| 3. CHCl_3 -MeOH (40 : 1) | 9. CHCl_3 -MeOH (7 : 3) |
| 4. CHCl_3 -MeOH (30 : 1) | 10. CHCl_3 -MeOH (6 : 4) |
| 5. CHCl_3 -MeOH (20 : 1) | 11. CHCl_3 -MeOH (5 : 5) |
| 6. CHCl_3 -MeOH (15 : 1) | 12. CHCl_3 -MeOH (0 : 100) |

Terpilih fase gerak terbaik adalah no.8 yaitu fase gerak dengan perbandingan kloroform : metanol = 8 : 2. Terhadap hasil fraksinasi dari ekstrak kloroform dilihat pemisahannya dengan menggunakan fase gerak terpilih. Dari fraksi ke 8 dapat diperoleh isolat 1.



Gambar 5.3 Kromatogram hasil KLT Fraksi 1-9 dari daun *C. siamea* Lamk dengan menggunakan eluen CHCl_3 : Metanol = 8 : 2 dan penampak noda Dragendorff

Terhadap fraksi C5 dilanjutkan proses isolasinya dengan menggunakan kromatografi kolom dengan serangkaian fase gerak. Dari fraksi C-5.2 didapatkan isolat 2 dan dari fraksi C-5.3 didapatkan isolat 3.



Gambar 5.4 Kromatogram hasil KLT Fraksi C5.1 – C5.4 dari daun *C. siamea* Lamk dengan menggunakan Eluen CHCl_3 : Metanol = 17 : 3 dan penampak noda Dragendorff

5.1.1 Identifikasi Isolat 1, Isolat 2 dan Isolat 3

5.1.1.1 Hasil Identifikasi Isolat 1

5.1.1.1.1 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri RMI

Gambar Spektrum RMI-¹H dan RMI-¹³C isolat 1 dalam CDCl₃/CD₃OD dari daun *C. siamea* Lamk menggunakan alat Bruker AV 400 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 1.1 dan lampiran 1.2, sedangkan data spektrum dapat dilihat pada tabel 4.1 di bawah ini.

Tabel 5.1 Data spektrum RMI-¹H dan RMI-¹³C isolat 1

Posisi Karbon	δ H	δ C
2	-	168
3	6.74 (1H,s)	97.3
4	-	148.6
4a	-	109.3
5	-	136.5
6	6.48 (1H,s)	107.9
7	-	174.6
8	6.60 (1H,s)	105.1
8a	-	156.7
9	2.43 (3H,s)	21.0
10	6.78 (1H,s)	117.1
11	-	141.4
12	2.50 (3H,s)	20.2
13	4.10 (2H,t,J=8,5)	48.0
14	1.98 (2H,m)	23.8
15	2.57 (2H,t,J = 6.3)	30.3
16	-	174.4
17	3.72 (3H,s)	52.3

5.1.1.1.2 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri Massa

Berdasarkan analisis spektrometri massa ESIMS menggunakan alat Micromass LCT spektrometri diperoleh spektra massa seperti pada lampiran 1.7 dan lampiran 1.8. Dari data spektra ESIMS isolat 1 tersebut menunjukkan adanya puncak ion molekul m/z : 314 ($M+H$)⁺ dan berat molekul diperhitungkan sebagai C₁₈H₁₉NO₄ dengan menggunakan HRESIMS (m/z 314.1387 ($M+H$)⁺, Δ - 0.6 mmu).

5.1.1.1.3 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri FT-IR

Spektrum IR (KBr) dari isolat 1 menggunakan alat Jasco FTIR-230 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 1.9. Pada gambar spektrum inframerah tersebut dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat yang menunjukkan keton terkonjugasi pada bilangan gelombang 1650 cm^{-1} serta gugus fungsional ester pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} .

5.1.1.2 Hasil Identifikasi Isolat 2

5.1.1.2.1 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri RMI

Gambar Spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C isolat 2 dalam $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ dari daun *C. siamea* Lamk menggunakan alat Bruker AV 400 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 2.1 dan lampiran 2.2 sedangkan data spektrum dapat dilihat pada tabel 4.2 di bawah ini.

Tabel 5.2 Data spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C dari isolat 2

Posisi Karbon	δH	δC
1a	-	156.80
2	-	176.5
3	6.47	108.74
3a	-	133.27
4	6.34	113.92
5	-	184.04
6	6.44	106.12
6a	-	159.92
8	-	169.77
9	6.35	100.02
10	-	163.03
11	2.44	19.22
12	2.30	19.22

5.1.1.2.2 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrometri Massa

Berdasarkan analisis spektrometri massa menggunakan alat Micromass LCT spektrometri diperoleh spektra massa seperti pada lampiran 2.7. Dari data spektra ESIMS isolat 2 tersebut menunjukkan adanya puncak ion molekul m/z : 214.0629 dan berat molekul diperhitungkan sebagai $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$.

5.1.1.2.3 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri FT-IR

Spektrum IR (KBr) dari isolat 2 menggunakan alat Jasco FTIR-230 spektrometer dapat dilihat pada gambar lampiran 2.8. Pada gambar spektrum inframerah tersebut dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat pada 1680 cm^{-1} yang menunjukkan gugus karbonil, 1590 cm^{-1} yang spesifik untuk cincin aromatik dan 1470 cm^{-1} yang menunjukkan C-H dari gugus metil.

5.1.1.3 Hasil Identifikasi Isolat 3

5.1.1.3.1 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri RMI

Gambar Spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C isolat 3 dalam $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ dari daun *C. siamea* Lamk menggunakan alat Bruker AV 400 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 3.1 dan lampiran 3.2 dan data spektrum dapat dilihat pada tabel 5.3 di bawah ini.

Tabel 5.3 Data spektrum RMI- ^1H dan RMI- ^{13}C isolat 3

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

5.1.1.3.2 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri Massa

Berdasarkan analisis spektrometri massa ESIMS menggunakan alat Micromass LCT spektrometer diperoleh spektra massa seperti pada lampiran 3.8. Dari data spektra ESIMS isolat 3 tersebut menunjukkan adanya puncak ion molekul $m/z : 214 (\text{M}+\text{H})^+$ dan berat

molekul diperhitungkan sebagai $C_{13}H_{11}NO_2$ ($M+H$)⁺ menggunakan HRESIMS (m/z 214.0890 ($M+H$)⁺, $\Delta + 2.2$ mmu).

5.1.1.3.3 Hasil Identifikasi dengan Menggunakan Spektrofotometri FT-IR

Gambar spektrum IR (KBR) dari isolat 3 dengan menggunakan alat Jasco FTIR-230 spektrometer dapat dilihat pada lampiran 3.7. 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} .

5.2 Hasil Uji Antimalaria secara *In Vitro* dari Senyawa Hasil Isolasi Daun *C. siamea*

Lamk

Hasil uji aktivitas antimalaria *in vitro* terhadap senyawa hasil isolasi daun *C. siamea*

Lamk dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 5.4 Nilai IC_{50} dari senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk pada uji antimalaria *in vitro* terhadap *P. falciparum* 3D7 sensitif klorokuin

Bahan Uji	Rata-rata % hambatan					IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} (μM)
	D1	D2	D3	D4	D5		
cassiarin B (1)	54,19	36,4	22,3	17,73	7,54	6,88	21.91
Anhydrobarakol (2)	58,63	30,34	23,15	17,77	11,22	7,75	36.22
cassiarin A (3)	100	73,74	62,60	53,36	43,70	0,001	0.005
Klorokuin	100	80,91	72,12	70,36	24,88	0,006	0.012

Keterangan tabel:

D1 = Dosis $10\ \mu\text{g/ml}$; D2 = Dosis $1\ \mu\text{g/ml}$; D3 = Dosis $0,1\ \mu\text{g/ml}$; D4 = Dosis $0,01\ \mu\text{g/ml}$; D5 = Dosis $0,001\ \mu\text{g/ml}$

Sedang hasil uji aktivitas antimalaria *in vitro* dari senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk terhadap *P. falciparum* G2300 dapat dilihat di bawah ini.

Tabel 5.5 Nilai IC_{50} dari senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk pada uji antimalaria *in vitro* terhadap *P. falciparum* G2300

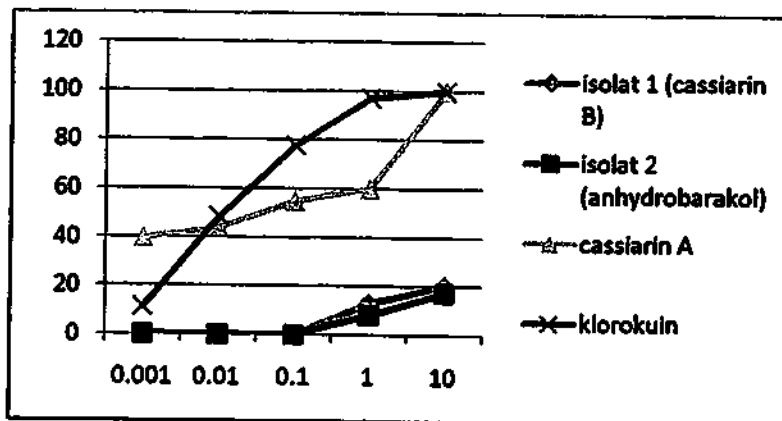
Bahan Uji	Rata-rata % hambatan					IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} (μM)
	D1	D2	D3	D4	D5		
Isolat 1 (Cassiarin B)	20,48	13,04	0	0	0	-	-
Isolat 2 (Anhydrobarakol)	17,29	8,12	0	0	0	-	-
isolate 3 (Cassiarin A)	100	60,18	55,04	43,88	39,75	0,035	0,16
Klorokuin difosfat	100	97.25	77.72	48.5	11.5	0.014	0.03

Keterangan Tabel:

D1 = Dosis 10 $\mu\text{g/ml}$; D2 = Dosis 1 $\mu\text{g/ml}$; D3 = Dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$; D4 = Dosis 0,01 $\mu\text{g/ml}$; D5 = Dosis 0,001 $\mu\text{g/ml}$

Dari hasil di atas dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} isolat 2 (cassiarin A) lebih kecil dibandingkan nilai IC_{50} dari isolat lainnya. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat 2 (cassiarin A) paling potensial dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* 3D7 dan *P. falciparum* G2300 dibandingkan senyawa lain hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk.

Adapun grafik dari rata-rata persen penghambatan antara senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* dan klorokuin difosfat terhadap isolat *P. falciparum* G2300 dapat dilihat dibawah ini.



Gambar 5.5 Grafik rata-rata persen penghambatan senyawa cassiarin A dan klorokuin difosfat terhadap *P. falciparum* G2300

5.3 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Cassiarin A Daun *C. siamea* Lamk terhadap *P. berghei* secara *In vivo* pada Hewan Coba Mencit

Terhadap senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk yang menunjukkan aktivitas paling potensial dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro* yaitu senyawa cassiarin A, selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* dan sebagai pembanding digunakan klorokuin difosfat. Hasil dari uji aktivitas antimalaria dari senyawa Cassiarin A dan klorokuin difosfat secara *in vivo* dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.6 Persen parasitemia senyawa Cassiarin A dari daun *C. siamea* pada H0-H4

Dosis (mg/kg BB)		H0 (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)
0	1	0.46	4.55	24.34	26.21	32.27
	2	0.16	4.6	11.45	16.92	22.4
	3	0.14	3.87	14.39	22.76	23.64
	4	0.30	4.75	13.70	19.93	24.50
	5	0.44	6.35	8.39	18.22	17.25
	6	0.58	4.28	9.81	15.69	26.64
2	1	0.02	2.01	9.72	10.28	8.68
	2	0.02	1.78	7.68	8.94	11.31
	3	0.12	1.94	8.42	10.05	12.06
	4	0.20	2.60	8.01	9.24	7.98
	5	0.06	1.99	8.20	9.50	10.30
	6	0.20	1.59	7.01	8.66	7.44
0.2	1	0.12	1.33	10.65	11.58	7.68
	2	0.44	1.40	8.20	10.37	9.08
	3	0.06	0.91	9.06	12.29	8.85
	4	0.83	0.76	11.16	12.79	8.87
	5	0.26	1.62	9.85	11.96	9.15
	6	0.32	1.21	9.79	11.77	8.78
0.02	1	0.10	1.64	11.28	15.14	10.32
	2	0.16	2.91	10.42	15.06	14.91
	3	0	0.08	1.20	2.09	13.23
	4	0.14	2.75	6.43	18.61	5.97
	5	0.02	0.04	0.08	4.65	8.88
	6	0.03	1.5	5.89	11.16	14.11
	1	0.08	3.07	11.72	14.8	15.04
	2	0.14	1.96	4.54	17.94	11.33

0.002	3	0.24	3.52	15.84	16.96	16.61
	4	0.08	0.74	8.25	17.94	11.37
	5	0.15	2.22	10.3	16.59	14.06
	6	0.28	1.85	11.11	15.38	15.10

Keterangan :

H0 = Parasitemia pada hari ke 0

H3 = Parasitemia pada Hari ke 3

H1 = Parasitemia pada hari ke 1

H4 = Parasitemia pada Hari ke 4

H2 = Parasitemia pada hari ke 2

Tabel 5.7 Persen parasitemia klorokuin difosfat pada H0-H4

Dosis (mg/kg BB)		H0 (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)
0	1	0.46	4.55	24.34	26.21	32.27
	2	0.16	4.6	11.45	16.92	22.4
	3	0.14	3.87	14.39	22.76	23.64
	4	0.30	4.75	13.70	19.93	24.50
	5	0.44	6.35	8.39	18.22	17.25
	6	0.58	4.28	9.81	15.69	26.64
2	1	0.62	1.6	7.27	10.78	6.97
	2	0.08	2.06	7.97	9.52	4.35
	3	0.11	1.99	9.21	11.84	8.85
	4	0.02	1.4	14.79	14.52	10.59
	5	0.09	1.94	9.39	10.78	7.00
	6	0.23	2.63	7.77	6.81	4.18
0.2	1	0.11	2.4	8.37	11.49	7.87
	2	0.12	2.5	12.98	11.41	10.48
	3	0.10	2.44	11.08	9.96	11.39
	4	0.08	2.19	9.8	8.72	12.02
	5	0.13	2.63	12.8	8.15	7.83
0.02	1	0.10	2.99	10.43	8.31	11.22
	2	0.3	3.49	10.9	5.00	4.17
	3	0.27	0.84	15.91	12.10	9.01
	4	0.09	1.86	4.99	5.95	15.32
	5	0.07	8.01	14.99	10.76	8.6
	6	0.03	0.8	5.3	7.66	10.14
0.002	1	0.23	7.63	16.84	17.14	14.42
	2	0.35	6.22	18.4	21.11	11.27
	3	0.28	6.74	17.33	18.41	17.61
	4	5.71	11.67	15.13	12.52	12.52
	5	0.82	6.99	16.01	16.30	13.89
	6	0.34	3.13	12.61	12.22	11.72

Keterangan :

H0 = Parasitemia pada hari ke 0

H3 = Parasitemia pada Hari ke 3

H1 = Parasitemia pada hari ke 1

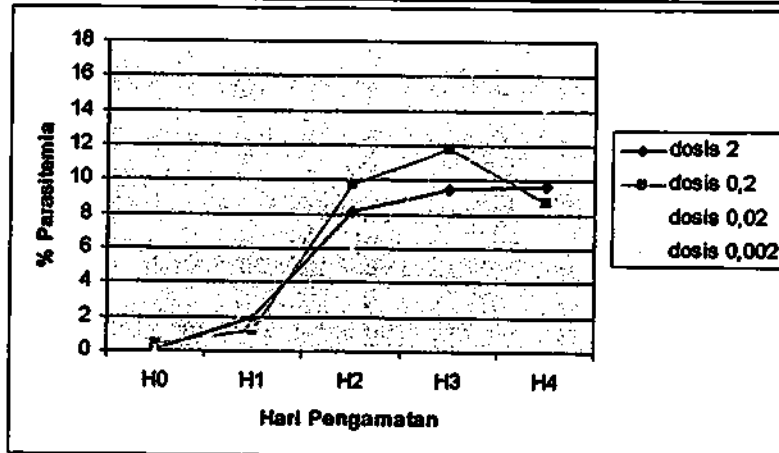
H4 = Parasitemia pada Hari ke 4

H2 = Parasitemia pada hari ke 2

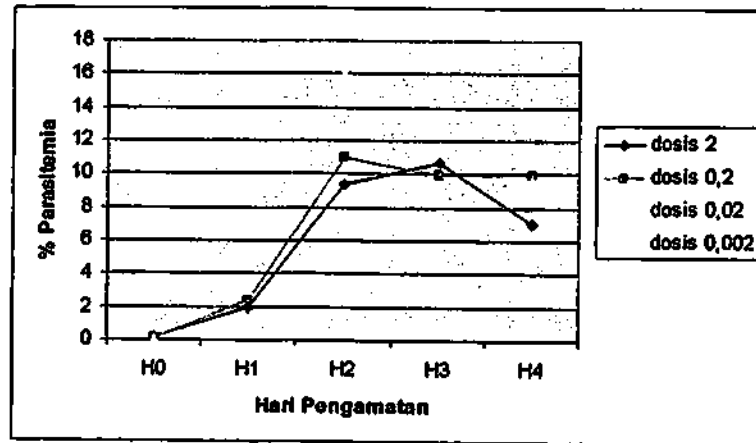
Untuk melihat perkembangan dari pertumbuhan *P. berghei* dengan pemberian bermacam-macam dosis dari bahan uji Cassiarin A maupun klorokuin difosfat sebagai senyawa standar dapat dilihat pada tabel 5.8 dan gambar 5.6 di bawah ini.

Tabel 5.8 Rata-rata persen parasitemia dari *P. berghei* setelah pemberian cassiarin A, klorokuin difosfat dan kontrol negatif selama 4 hari secara i.p.

Bahan	Dosis (mg/Kg/BB)	Rata-rata Persen parasitemia				
		Do	D1	D2	D3	D4
Cassiarin A	2	0.10 ±0.08	1.98 ±0.34	8.17 ±0.90	9.44 ±0.63	9.63 ±1.88
	0.2	0.34 ±0.28	1.20 ±0.32	9.78 ±1.07	11.79±0.82	8.72 ±0.54
	0.02	0.08 ±0.07	1.49 ±1.24	5.88 ±4.60	11.12±6.50	11.24±3.46
	0.002	0.16 ±0.08	2.23 ±0.98	10.29±3.76	16.60±1.30	13.92±2.15
Klorokuin difosfat	2	0.19 ±0.22	1.94 ±0.42	9.40 ±2.77	10.71±2.55	6.99 ±2.50
	0.2	0.11 ±0.02	2.43 ±0.16	11.01±1.97	9.95 ±1.32	9.92 ±1.97
	0.02	0.14 ±0.11	3.00 ±2.69	10.42±4.42	8.30 ±2.73	9.74 ±3.64
	0.002	1.29 ±2.18	7.06 ±2.75	16.05±2.02	16.28±3.44	13.57±2.32
Kontrol -	-	0.35 ±0.18	4.73 ±0.85	13.68±5.69	19.96±3.93	24.45±4.95



Gambar 5.6 Grafik persen parasitemia hasil pemberian cassiarin A dan kontrol negatif mulai H0-H4



Gambar 5.7 Grafik persen parasitemia hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif mulai H0-H4

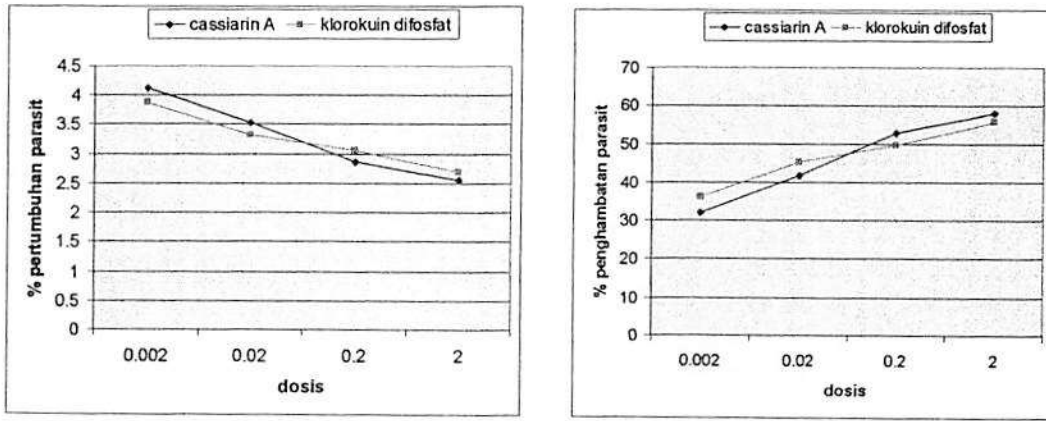
Data hasil uji antimalaria selanjutnya dianalisis menggunakan analisis probit untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing senyawa yang diujikan.

Tabel 5.9 di bawah ini menunjukkan nilai IC_{50} dari senyawa Cassiarin A hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk. Dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} Cassiarin A lebih kecil dibandingkan nilai IC_{50} dari klorokuin difosfat sebagai senyawa standar.

Tabel 5.9 Aktivitas antimalaria Cassiarin A dan klorokuin difosfat terhadap mencit terinfeksi *P. berghei* secara i.p selama 4 hari pemberian

Sampel	Dosis (mg/kg/hari)	Rata-rata % pertumbuhan parasit	Rata-rata % Penghambatan	ED_{50} (mg/kg BB)
Cassiarin A	2	$2,55 \pm 0,36$	57,99	0,17
	0,2	$2,86 \pm 0,23$	52,88	
	0,02	$3,53 \pm 0,87$	41,84	
	0,002	$4,12 \pm 0,35$	32,12	
Klorokuin difosfat	2	$2,68 \pm 0,68$	55,85	0,21
	0,2	$3,06 \pm 0,17$	49,59	
	0,02	$3,32 \pm 0,68$	45,31	
	0,002	$3,88 \pm 1,14$	36,08	
Kontrol	-	$6,07 \pm 1,29$	-	

Berikut adalah grafik dari aktivitas antimalaria dari cassiarin A dan klorokuin difosfat sebagai kontrol positif terhadap pertumbuhan *P. berghei*.



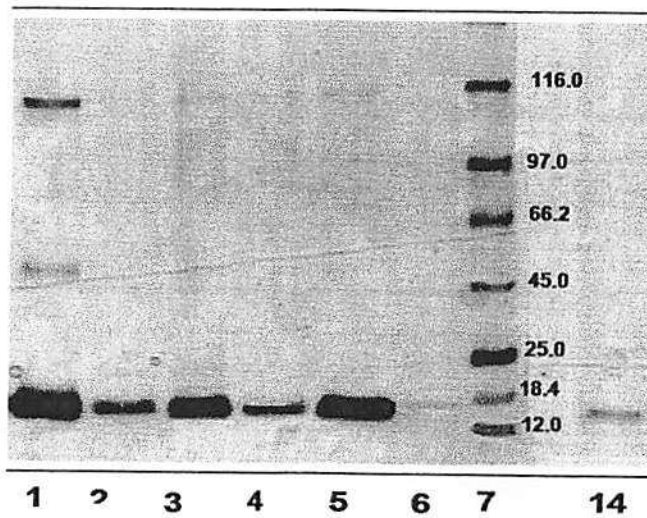
A

B

Gambar 5.8 Pengaruh cassiarin A pada A, % pertumbuhan parasit dan B % penghambatan parasit pada mencit terinfeksi *P. berghei* secara in vivo

5.4 Hasil Uji Efek Senyawa Aktif Antimalaria terhadap Degradasi Hemoglobin

Hasil elektroforesis dengan menggunakan pewarnaan perak nitrat disajikan pada gambar 5.9 di bawah ini.



Gambar 5.9 Hasil Elektroforesis *P.falciparum* pada pemberian senyawa aktif dibandingkan dengan marker

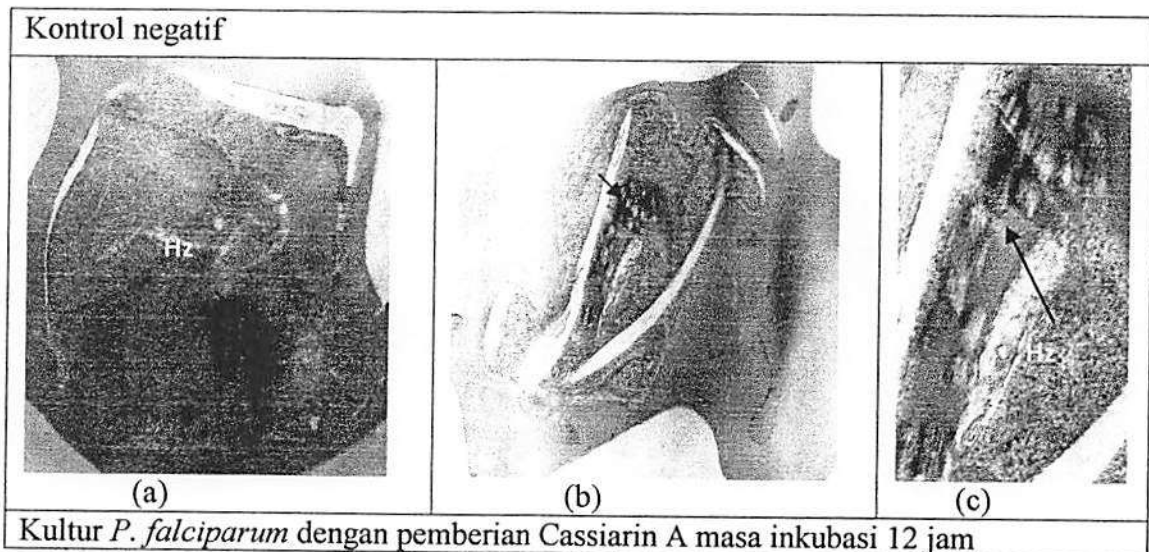
Keterangan gambar:

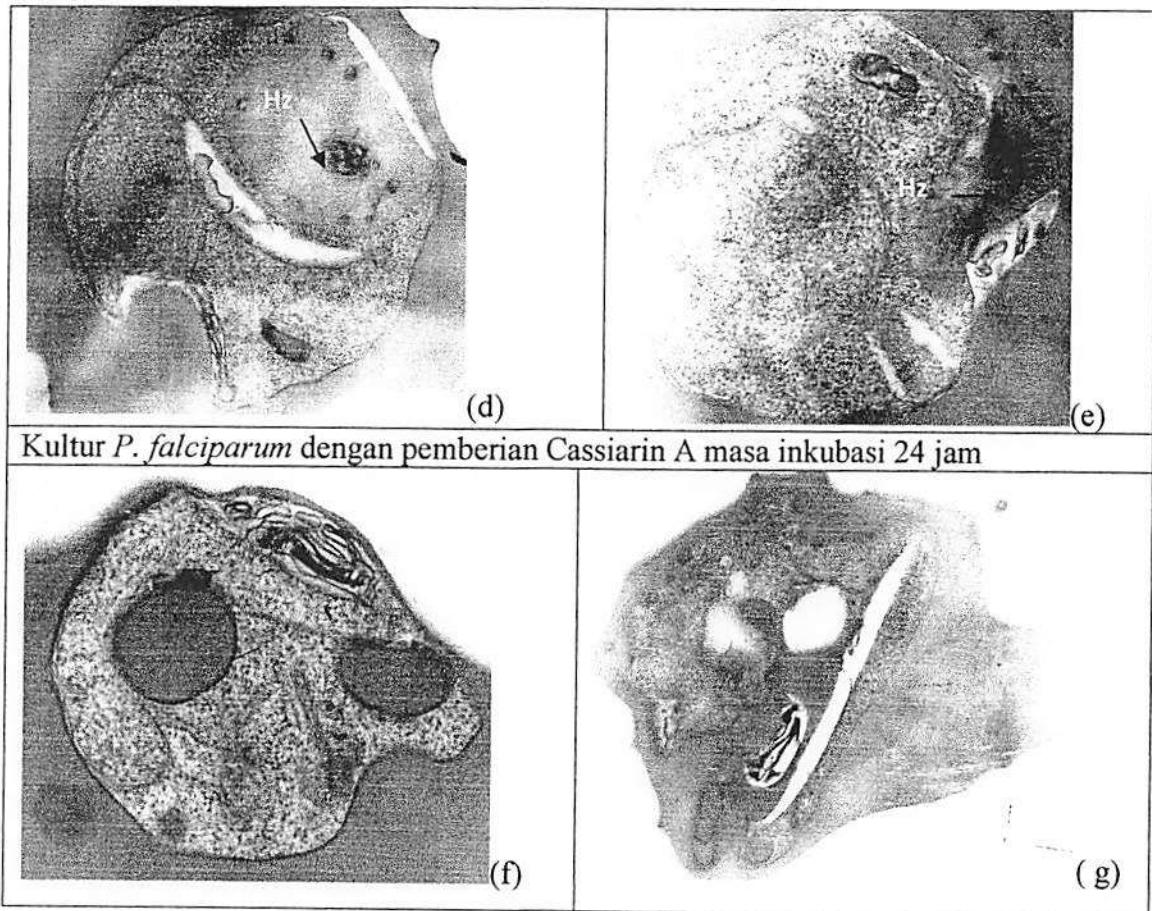
Hemoglobin standart (line 1), Cassiarin A 0-jam (line 2), Cassiarin A 6-jam (line 3), kontrol negatif 0-jam (line 6), Low marker protein (Biorad) (line 7), Kontrol negatif 6-jam (line 14).

Berdasarkan Gambar 5.9 nampak bahwa hasil SDS-PAGE, pada pengamatan 0 jam, terlihat adanya pita globin yang sangat tipis baik pada kultur parasit yang diberikan senyawa cassiarin A maupun kontrol negatif tanpa pemberian senyawa aktif (line 6). Selanjutnya hasil SDS-PAGE parasit malaria yang diinkubasi selama 6 jam dengan senyawa cassiarin A (line 3) nampak adanya pita globin yang tebal pada 16 kDa. Hal ini sesuai dengan yang ditunjukkan juga oleh marker protein (line 7) dan hemoglobin standart (line1) dan sangat berbeda dengan kontrol negatif dimana hanya terlihat pita globin yang tipis seperti pada 0 jam (line 14).

5.5 Hasil Uji adanya hambatan detoksifikasi heme dengan pengamatan Transmisi Elektron Microscop (TEM)

Hasil efek senyawa Cassiarin A pada penghambatan detoksifikasi heme dari parasit dengan pengamatan menggunakan mikroskop elektron dapat dilihat pada gambar dibawah ini





Gambar 5.10 Pada 10 (a,) (b) dan (c) dapat dilihat adanya bentukan hemozoin yang sempurna pada kultur tanpa pemberian bahan uji, sedang pada 10 (d) dan (e) adalah kultur dengan pemberian cassiarin A dengan masa inkubasi 12 jam terlihat masih adanya sedikit hemozoin yang sudah tidak sempurna dan pada 1 (f) dan (g) pada kultur yang diberi cassiarin A dengan masa inkubasi 24 jam sudah tidak terlihat lagi adanya hemozoin

BAB VI

PEMBAHASAN

Penemuan obat baru tetap menjadi tujuan utama dalam upaya penanggulangan malaria. Beberapa senyawa yang telah menunjukkan aktivitas sebagai antimalaria antara lain adalah senyawa golongan alkaloid, terpenoid, antrakuinon, naftokuinon, kumarin, lignan, khalkon dan flavonoid (Tringali, 2001). Senyawa golongan alkaloid, terpenoid dan antrakuinon merupakan senyawa kandungan utama dari daun *C. siamea* (Depkes RI, 1989). Pada penelitian kali ini telah berhasil diisolasi beberapa senyawa dari daun tanaman *C. siamea* Lamk berikut aktivitasnya sebagai antimalaria.

6.1 Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi Daun *C. siamea* Lamk

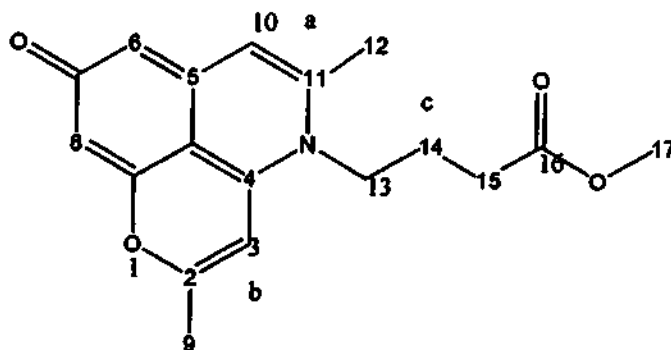
6.1.1 Identifikasi Isolat 1

Hasil analisis terhadap isolat 1, dengan metode KLT menunjukkan bercak tunggal pada $R_f : 0,4$ dengan menggunakan fase gerak kloroform : etanol = 8 : 2 dengan penampak noda dragendorf. Berdasar data spektrum inframerah dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat yang menunjukkan keton terkonjugasi pada bilangan gelombang 1650 cm^{-1} serta gugus fungsional ester pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} .

Spektrum dari ^{13}C NMR dalam $\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD}$ (1:1) menghasilkan 18 signal karbon terdiri dari dua karbon karbonil, enam karbon kuarterner, empat metin, tiga metilen, dan tiga metil. Diantara atom karbon tersebut yaitu enam karbon kuarterner (δ_{C} 109.3, 136.5, 141.4, 148.6, 156.7 dan 168.0), satu metilene (δ_{C} 48.0; δ_{H} 4.10) dan satu metil (δ_{C} 52.3; δ_{H} 3.72) berhubungan dengan atom nitrogen atau oksigen.

Spektra ^1H - ^1H COSY memperlihatkan hubungan tiga bagian struktur yaitu a (C-10 – C-12), b (C-9 ke C-3) dan c (C-13 ke C-15). Pada bagian c memperlihatkan korelasi HMBC untuk H_2 -14 dan H_3 -17 pada C-16 yang mengindikasikan adanya metil butanoat (C-13 ke C-17). Hubungan C-13 ke C-4 dan C-11 melalui atom nitrogen diimplikasikan dengan korelasi untuk H_2 -13 ke C-4 dan C-11. Data 2D NMR dari isolat 1 termasuk ^1H - ^1H COSY, HSQC dan HMBC menunjukkan isokuinolin-6(2H), struktur dengan N-substitusi dengan metilbutanoat didukung dengan korelasi NOESY. Jadi isolat 1 disimpulkan terdiri dari 3-metil-6-oksoisokuinolin butanoat dan 2- cincin metilpyran.

Berdasarkan kajian pustaka, maka dapat dikatakan bahwa data spektra dari isolat 1 ini sama dengan senyawa cassiarin B (Morita, 2007), dengan struktur sebagai berikut:



6.1.2 Identifikasi Isolat 2

Hasil analisis terhadap isolat 2, dengan metode KLT menunjukkan bercak tunggal pada R_f : 0,62 menggunakan fase gerak kloroform : metanol = 17 : 3.

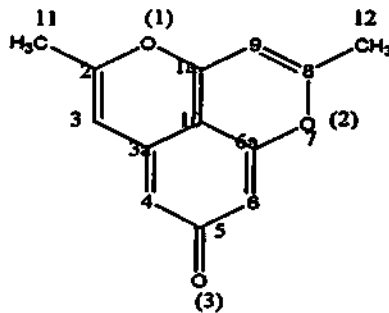
Berdasar data spektrum inframerah dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat pada 1680 cm^{-1} yang menunjukkan gugus karbonil, 1590 cm^{-1} yang spesifik untuk cincin aromatik dan 1470 cm^{-1} yang menunjukkan C-H dari gugus metil.

Spektrum dari ^{13}C NMR dalam CDCl_3 menghasil 13 signal karbon, terdiri dari satu atom C karbonil, tujuh karbon kuarternar, empat metin, dan dua metil. Diantara atom C

tersebut, empat karbon kuartern berdekatan dengan O (δ_C 184.04, δ_C 100.02, δ_C 156.80 dan δ_C 176.5). Sedang spektrum ^1H NMR dalam MeOD mengindikasikan adanya 2 metil berikatan dengan cincin aromatik pada C2 dan C8, juga terdapat 4 proton pada cincin aromatik (δ_H 6.47, δ_H 6.34, δ_H 6.44 dan δ_H 6.35).

Hasil data spektra ESIMS isolat 2 tersebut menunjukkan adanya puncak ion molekul m/z : 214.0629 dan berat molekul diperhitungkan sebagai $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$.

Berdasarkan kajian pustaka, maka dapat dikatakan bahwa data spektra dari isolat 2 ini sama dengan senyawa anhydrobarakol (Bycroft, 1970; Morita, 2007) dengan struktur sebagai berikut:



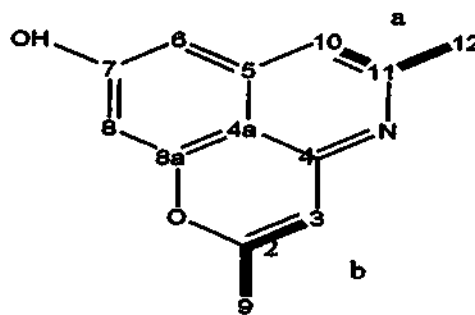
6.1.3 Identifikasi Isolat 3

Hasil analisis terhadap isolat 3, dengan metode KLT menunjukkan bercak (*spot*) tunggal pada R_f : 0,45 dengan menggunakan fase gerak Kloroform : etanol = 8 : 2. Identifikasi menggunakan penampak noda dragendorff menunjukkan 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, diantaranya terdapat lima karbon kuartern (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 sampai C-12) dan b (dari C-9 sampai C-2 dan C-3) disimpulkan dari analisis menggunakan ^1H - ^1H COSY dengan menggunakan fase gerak CDCl_3 - CD_3OD (1:1). Adanya 4-substitusi cincin benzene dengan gugus hidroksil diperoleh dari data korelasi HMBC. Korelasi data HMBC untuk H-10 pada C-4a (δ_{C} 111.5) dan C-5 (δ_{C} 138.8) serta untuk H-3 pada 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 benzene dapat diketahui dari korelasi NOESY antara H-6 dan H-1, 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 alkaloid 3 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 alkaloid 3 menunjukkan adanya puncak ion molekul m/z : 214 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ dan berat molekul diperhitungkan sebagai $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ menggunakan HRESIMS (m/z 214.0890 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, $\Delta + 2.2$ mmu).

Berdasarkan kajian pustaka, maka dapat dikatakan bahwa data spektra dari isolat 3 ini sama dengan senyawa cassiarin A (Morita, 2007) dengan struktur sebagai berikut:



6.2 Aktivitas Antimalaria Senyawa Hasil Isolasi Daun *C. siamea* Lamk terhadap *P. falciparum* *in vitro*

Penelitian pendahuluan tentang aktivitas daun *C. siamea* Lamk sebagai antimalaria menunjukkan bahwa dari tanaman ini terkandung senyawa aktif antimalaria yang potensial untuk dikembangkan (Ekasari, 2004; Ekasari, 2005). Untuk itu penelitian tentang aktivitas antimalaria tanaman ini dilanjutkan dengan melakukan isolasi dan pemurnian dari ekstrak daun *C. siamea* Lamk yang menghasilkan tiga macam isolat. Hasil uji antimalaria ketiga senyawa hasil isolasi terhadap *P. falciparum* strain 3D7 menunjukkan bahwa senyawa cassiarin A dari golongan alkaloid mempunyai aktivitas antimalaria yang paling potensial dengan harga IC_{50} sebesar $0,001 \mu\text{g/ml}$ atau $0,005 \mu\text{M}$ dibandingkan senyawa hasil isolasi lainnya.

Sedang hasil uji antimalaria ketiga senyawa hasil isolasi terhadap *P. falciparum* strain G2300 juga menunjukkan bahwa senyawa cassiarin A dari golongan alkaloid mempunyai aktivitas antimalaria yang paling potensial dengan harga IC_{50} sebesar $0,035 \mu\text{g/ml}$ atau $0,16 \mu\text{M}$ dibandingkan senyawa hasil isolasi lainnya.

Menurut Fidock (2004) suatu senyawa dianggap efektif sebagai antimalaria jika memiliki $IC_{50} < 1-5 \mu\text{M}$. Berdasarkan hal ini dapat dilihat bahwa senyawa cassiarin A efektif dan potensial untuk dikembangkan sebagai obat antimalaria.

Penelitian dilanjutkan dengan menguji aktivitas antimalaria secara *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* dari senyawa cassiarin A (senyawa paling aktif secara *in vitro*). Untuk diketahui pada semua jenis mamalia spesies *Plasmodium* mempunyai siklus hidup yang dapat dibandingkan dan sensitive terhadap obat yang sama sehingga dapat dianalogkan terhadap 4 spesies *Plasmodium* yang menyerang manusia (Landau, 1998).

Penelitian secara *in vivo* ini berguna untuk mengetahui aktivitas cassiarin A terhadap kondisi parasit secara langsung di tubuh inang. Didapatkan data bahwa cassiarin A mempunyai harga ED₅₀ sebesar 0,17 mg/Kg/BB sedang klorokuin difosfat mempunyai harga ED₅₀ sebesar 0,21 mg/Kg/BB

Aktivitas antimalaria senyawa cassiarin A dan cassiarin B sangat jauh berbeda, padahal kedua senyawa ini termasuk ke dalam satu golongan alkaloida dengan struktur kimia yang mirip. Diduga bahwa adanya ikatan rangkap dari cassiarin A pada posisi C-4 yang menyebabkan peningkatan aktivitas antimalariannya. Adanya ikatan rangkap ini membuat cassiarin A menjadi lebih non polar dan lipofilik dibandingkan cassiarin B sehingga mempengaruhi potensi senyawa cassiarin A berikatan dengan reseptor biologis. Sifat lipofilitas tinggi karena adanya ikatan rangkap (Siswandono,1998) tersebut menyebabkan cassiarin A lebih mudah melewati membran eritrosit maupun membran parasit sehingga dapat memberikan aktivitas antimalaria yang lebih tinggi.

6.3 Efek cassiarin A pada Proses Degradasi Hemoglobin

Analisis hambatan degradasi globin parasit malaria, dilakukan menggunakan *P.berghei* yang diinkubasi secara *in vitro* selama 0-6 jam. Pada proses preparasi untuk mengisolasi protein parasit, digunakan saponin untuk melisiskan membran eritrosit yang terinfeksi parasit tetapi tidak melisiskan membran parasit (Gamboa *et al.*, 1996). Selanjutnya kadar protein parasit ditentukan dengan menggunakan metode Bradford. Keuntungan metode ini adalah waktu yang dibutuhkan relatif cepat dan sensitif (Deutscher, 1990; Aulanni'am, 2004). Penentuan kadar ini sangat penting untuk menjaga supaya sampel yang masuk ke dalam sumur SDS-PAGE seragam sehingga akumulasi globin yang tidak terdegradasi dapat diketahui secara valid. Kemudian sejumlah

konsentrasi yang sama dari protein parasit yang telah diukur, dilarutkan dalam sampel buffer SDS-PAGE dan dielektroforesis dengan menggunakan 15% gel akrilamid. Hasil SDS-PAGE terhadap akumulasi globin dapat ditunjukkan dengan adanya pita (*band*) yang berwarna hitam pada posisi 16 kDa (Rosenthal, 1991).

Berdasarkan hasil SDS-PAGE, terlihat bahwa pada biakan parasit malaria yang diinkubasi selama 6-jam dengan senyawa cassiarin A terdapat band globin yang tebal pada 16 kDa yang sama seperti ditunjukkan oleh marker protein (line 7) dan hemoglobin standar (line 1). Sedangkan pada biakan parasit yang tidak diberikan senyawa aktif (kontrol negatif) terlihat band globin yang sangat tipis (line 14).

Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa cassiarin A dari daun *C. siamea* Lamk tersebut memiliki mekanisme aksi pada vakuola makanan parasit dengan menghambat proses degradasi hemoglobin. Pada parasit yang tidak diberi bahan uji, hemoglobin yang didapat langsung didegradasi menjadi heme dan globin yang selanjutnya terhidrolisis menjadi peptida-peptida kecil sehingga pada parasit yang tidak diberi bahan uji hanya terdapat pita globin yang sangat tipis. Pada parasit yang diberi bahan uji cassiarin A, terjadi hambatan hidrolisis globin menjadi peptida-peptida kecil, sehingga globin tersebut menumpuk pada vakuola makanan sehingga menyebabkan adanya pembengkakan dan globin yang tidak terhidrolisis tersebut dapat teramati sebagai pita globin pada SDS-PAGE.

Hambatan pada proses degradasi hemoglobin maupun globin juga sudah diketahui merupakan target obat antimalaria seperti klorokuin, artemisinin dan turunannya. Hal ini berarti bahwa senyawa cassiarin A hasil isolasi daun *C. siamea* Lamk dengan struktur kimia yang berbeda (isokuinolin) dengan klorokuin (kuinolin) dan artemisinin

(seskiterpen lakton), dapat menunjukkan efek yang sama terhadap parasit malaria. Namun struktur kimia yang berbeda ini sangat mungkin akan menimbulkan proses biokimiawi dan mekanisme aksi yang berbeda.

6.4 Efek Cassiarin A pada penghambatan Detoksifikasi Heme

Efek patologis dari senyawa cassiarin A pada *P. falciparum* dilakukan pengamatan ultra strukturnya dengan menggunakan mikroskop elektron. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada sedikit parasit yang masih ada pada kultur yang telah diberi cassiarin A dengan masa inkubasi 12 jam masih terlihat adanya bentukan hemozoin namun sudah mengalami kelainan. Sedang pada kultur dengan masa inkubasi 24 jam, hampir tidak terdapat adanya bentukan hemozoin pada vakuola makanan semua parasit. Hal sebaliknya terjadi pada kultur kontrol, dimana pada semua vakuola makanan parasit terdapat bentukan kristal hemozoin. Tidak adanya bentukan 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.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat dikemukakan bahwa senyawa cassiarin A memiliki aktivitas antimalaria yang poten, melalui hambatan pada proses degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme .

Menurut Siswandono (1998) bahwa, sifat-sifat kimia fisika memegang peran penting dalam pengangkutan obat untuk mencapai reseptor. Hanya obat-obat yang mempunyai struktur dengan kespesifikan tinggi saja yang dapat berinteraksi dengan reseptor biologis. Sifat-sifat lipofilik, elektronik dan sterik suatu gugus atau senyawa merupakan hal penting dalam menentukan aktivitas biologis tersebut.

Berdasarkan konsep ini dapat diinterpretasikan bahwa senyawa cassiarin A memiliki struktur kimia dengan kespesifikan tinggi, sehingga dapat berinteraksi dengan reseptor dengan menimbulkan hambatan pada proses degradasi hemoglobin maupun detoksifikasi heme sehingga dapat menimbulkan efek antimalaria yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. Oleh karena itu senyawa cassiarin A hasil isolasi daun *C. stamea* Lamk yang memiliki efek antimalaria poten dan aktivitas biokimiawi yang spesifik sangat prospektif dikembangkan sebagai obat antimalaria baru.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Hasil isolasi daun *C. siamea* didapatkan senyawa cassiarin A, cassiarin B dan Anhydrobarakol
2. Senyawa yang paling aktif secara *in vitro* dari daun *C. siamea* adalah cassiarin A
3. Hasil uji aktivitas antimalaria *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* didapatkan hasil bahwa cassiarin A lebih poten dibandingkan klorokuin difosfat
4. Mekanisme kerja dari cassiarin A adalah dengan penghambatan pada degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji mekanisme lain terhadap cassiarin A sehingga dapat diketahui dengan lengkap target biokimiawi dari senyawa ini terhadap parasit malaria.
2. Senyawa cassiarin A dari daun *C. siamea* Lamk sangat potensial untuk dijadikan obat malaria dan dapat dikembangkan sebagai senyawa penanda (marker) bagi keperluan pengembangan produk fitofarmaka.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klemba M, Goldberg DE, 2002. Four Plasmepsin are active in *Plasmodium falciparum* food vacuola including a protease with an active site histidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 9 : 990-995.
- 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.
- Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL, 2003. The transcriptom of the Intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*, *PlosBiol*1(1): e5Doi: 10.1371/journal.pbio.000005 (10 Januari 2007).
- Bozzola JJ, Russell LD, 1999. *Electron Microscopy principles and techniques for biologists*, 2nd, Jones and Barlet Publisher Sudbury Massachussetts. pp 1-261.
- Burke E, Deasy J, Hasson R, McCormack R, Randhawa V, Walsh P, 2003. Antimalarial Drug From Nature, *J Trinity Student Med.*
- DepKes Republik Indonesia., 1989, *Cassia siamea Folium*, *Materia Medika Indonesia*. Jilid V, Jakarta, hal 129-133.
- Egan TJ, Hunter R, Kashula CH, Marques HM, Mispion 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, Uji Antimalaria In Vitro Dari Ekstrak Etanol, Kloroform Daun Cassia 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*, (BBI). 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.

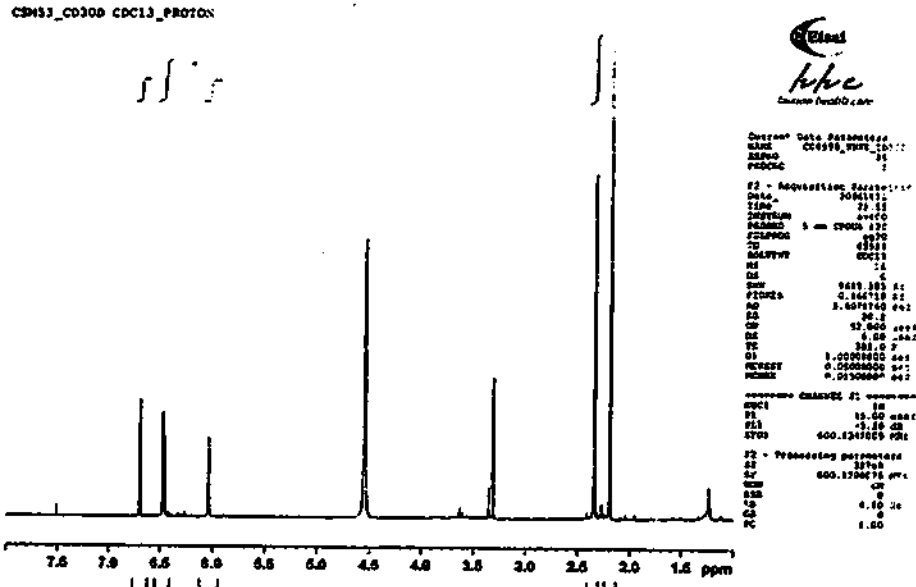
- Ekasari W, Aty W, Indah T, 2005. Uji antimalaria Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Daun *Cassia siamea* pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. (Penelitian Dosen Muda /BBI). Lemlit Unair Surabaya.
- Ekasari W., et al., 2005. Pengembangan Daun Johar (*Cassia siamea*) sebagai Fitofarmaka Antimalaria. (Penelitian BPOM). Tahun ke-I.
- Ekasari W.,et al., 2006. Pengembangan Daun Johar (*Cassia siamea*) sebagai Fitofarmaka Antimalaria. (Penelitian BPOM) Tahun ke-II.
- 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.
- 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 de Dominguez ND, Rosenthal PJ, 1996, Cysteine protease inhibitor block early steps in hemoglobin degradation by culture malaria parasite, *Blood* 87(10): 4448-4454.
- Gbeassor et al., 1989. Antimalarial Effect of Eight African Medicinal Plants. *J. Ethnopharmacology* 25 (1) : 115 – 118.
- Gritter RJ, 1991 (Terjemahan Padmawinata). Pengantar Kromatografi. Edisi III. Bandung, ITB.
- 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.
- Harborne JB, 1996. Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan (Terjemahan Kosasih P dan Iwang S), Ed 2, Bandung: Institut Teknologi Bandung, hlm 234-259.
- Hempelmann E, Motta C, Hughes R, Ward SA, Bray GP, 2003. *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? *Trend Parasitol* 19 (1): 23-26.
- Heyne K, 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid 3, Terjemahan Badan Litbang Kehutanan, Jakarta : hal. 926 – 927.
- Krettli AU, Andrade-Neto VF, Brando MGL, Wanessa MSF, 2001. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants used to Treat Fever and malaria or plant Randomly selected. *Mem. Inst. J Cruz Rio de janeiro* 96 (80) : 1033-1042.

- 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.
- Na BK, Shenai BR, Sijwali PS, Choe Y, Pandey KC, Singh A, Craik CS and Rosenthal PJ, 2004. Identification and biochemical Characterization of vivapains, cysteine protease of malaria parasite *Plasmodium vivax*. **J.Biochem** 378 : 529-538.
- 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.
- 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.
- Rathore D, Dewal J, Nagarkatti R, Kumar S, 2006. Heme detoxification and antimalarial drugs-Known mechanisms and future prospects. **Drug discovery today: therapeutic strategies** 3 (2): 153-158.
- Ratsimamanga-Urveg S et al., 1994. In vitro antiplasmodial activity and chloroquin-potentiating action of three new isoquinoline alkaloid dimers isolated from *Hernandia voyronii* Jumelle. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 88 (3) : 271 – 277.
- Ridley RG, 2002. Medicinal need, Scientific Opportunity and the Drive for antimalaria Drugs. **J Nature** 417 : 686-693.
- 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.
- Roth JH, Blascke G, 1988 (Terjemahan Sarjono K dan Slamet I). **Analisis Farmasi**. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hlm 424-426.
- Sherman IW, 1998. **Malaria, Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**, Washington, D.C: ASM press.
- Silverstein RM, 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.

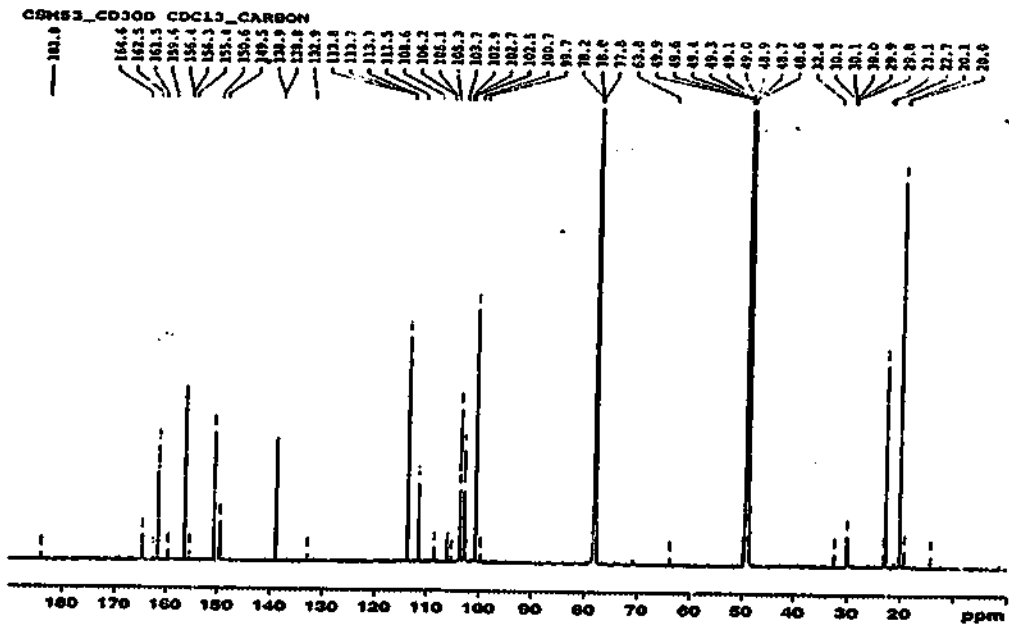
- Skoog A, 1981. **Principle of instrumental analysis**. Japan: Holt Sounder International, pp. 407-447, 523-565, 837-847.
- Stahl E, 1985. **Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi** (Terjemahan Kosasih P dan Iwang S), Bandung: Institut Teknologi Bandung, hlm 68-78.
- Tekwani BL, Walker LA, 2005. Targeting the hemozoin synthesis pathway for the new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro β -hematin formation assay. **Combinatorial high Throughput Screening**, 8:63-70.
- World Health Organization, 19 Mei 2003. **WHO report meeting on Antimalarial drug development**. Manila. <http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai>.
- Wiser, 2003. Mechanism of drug action and resistance (Focus on malarials) <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/summary.html#na> (2 Agustus 2008).
- Wisser MF, 2004. Cellular and molecular biology of *Plasmodium*. **Reviuw**, Tulane University, <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref-msp>, (2 Agustus 2008).
- Ziegler HL, Staerk D, Christensen J, Hviid L, Hagerstrand H, Jaroszewski JW, 2002. In vitro *Plasmodium falciparum* drug sensitivity assay: inhibition of parasite growth by incorporation of stomatocytogenic amphiphiles into erythrocyte membrane. **Antimicro Agents and Chemother** 46 (5): 1441-1446.

LAMPIRAN 1

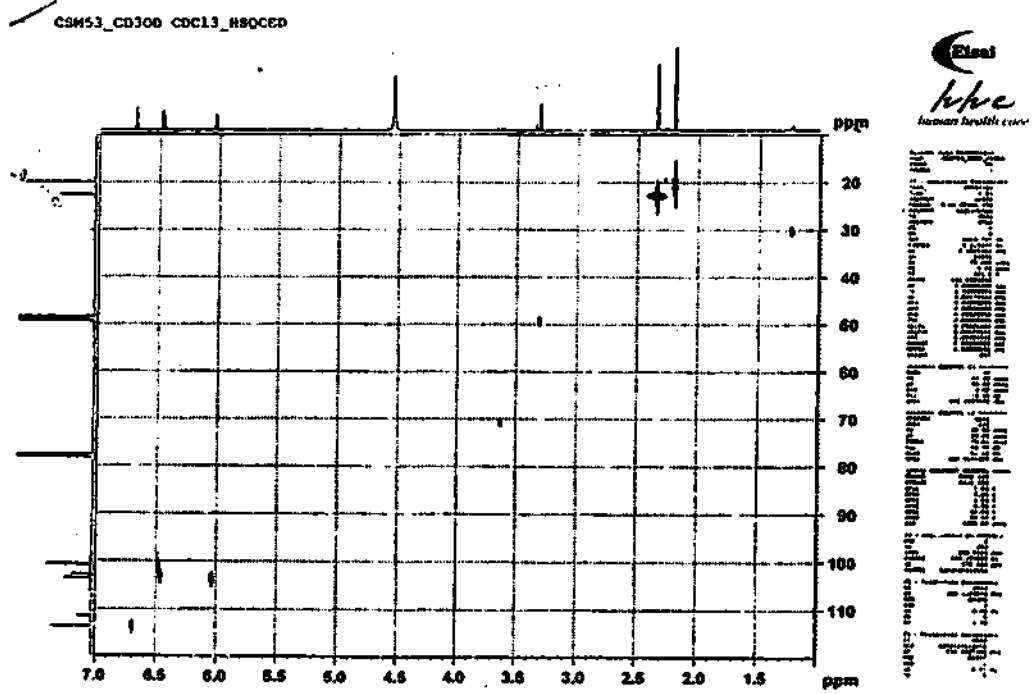
Hasil spektra cassiarinA



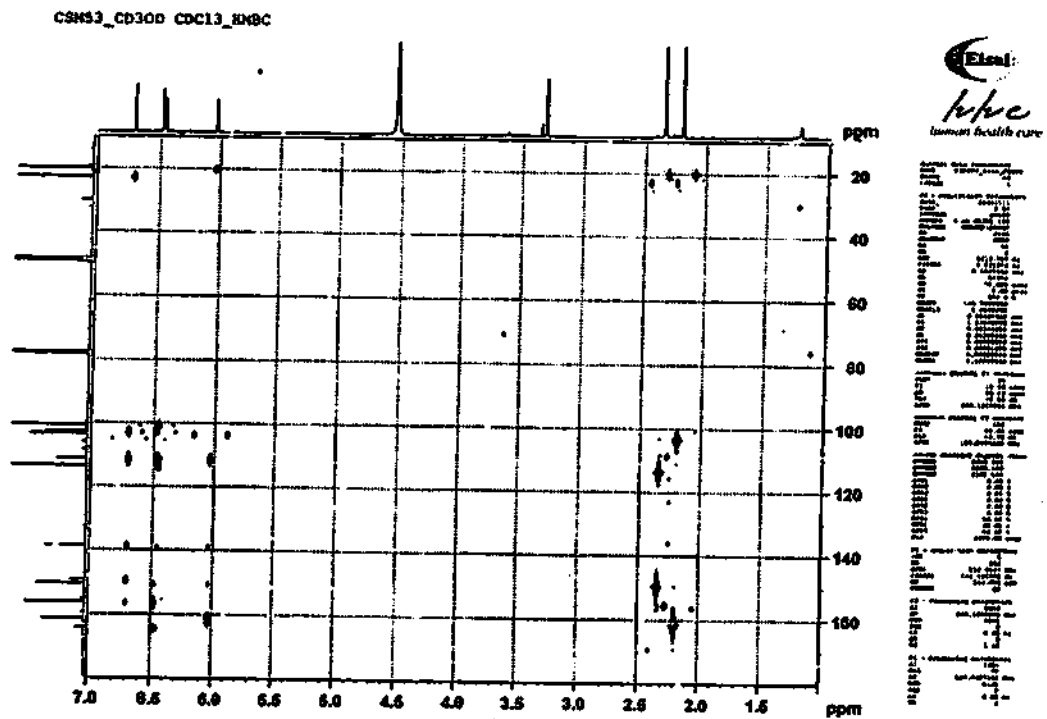
1.1 Spektrum RMI-¹H cassiarin A dalam CDCl₃/CD₃OD



1.2 Spektrum RMI-¹³C cassiarin A dalam CDCl₃/CD₃OD

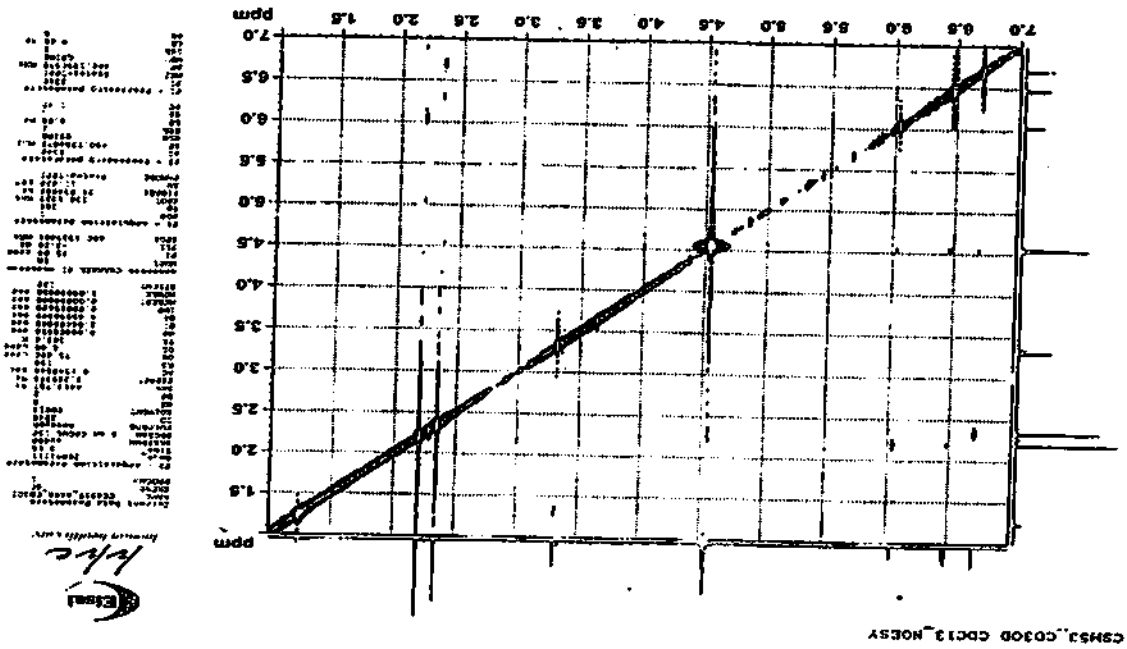


1.3 Spektrum RMI HSQCED cassiarin A

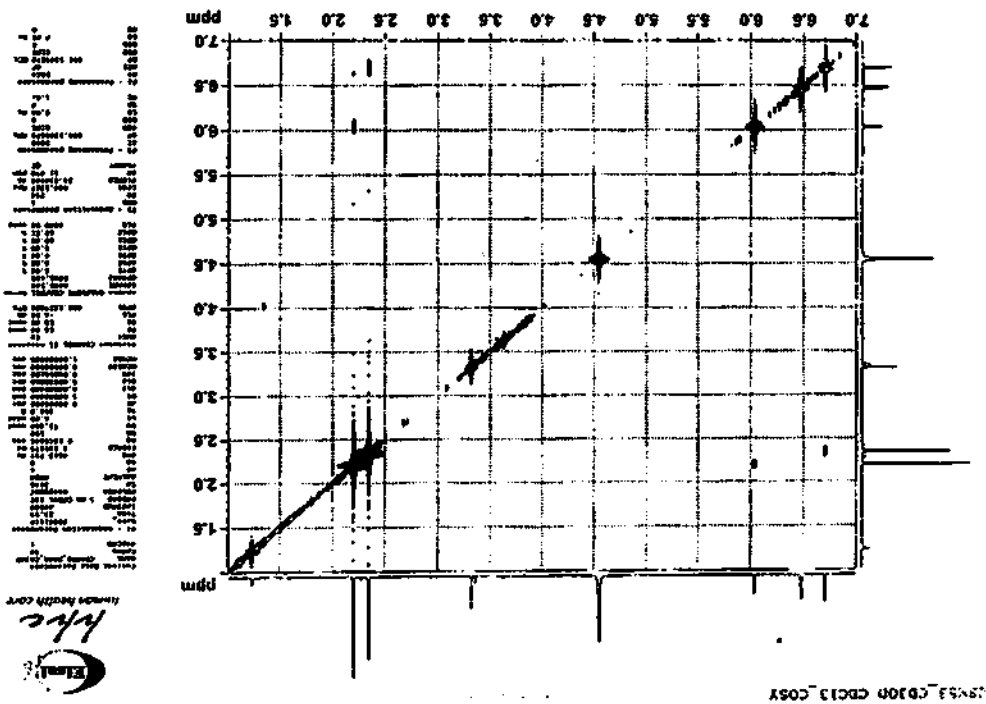


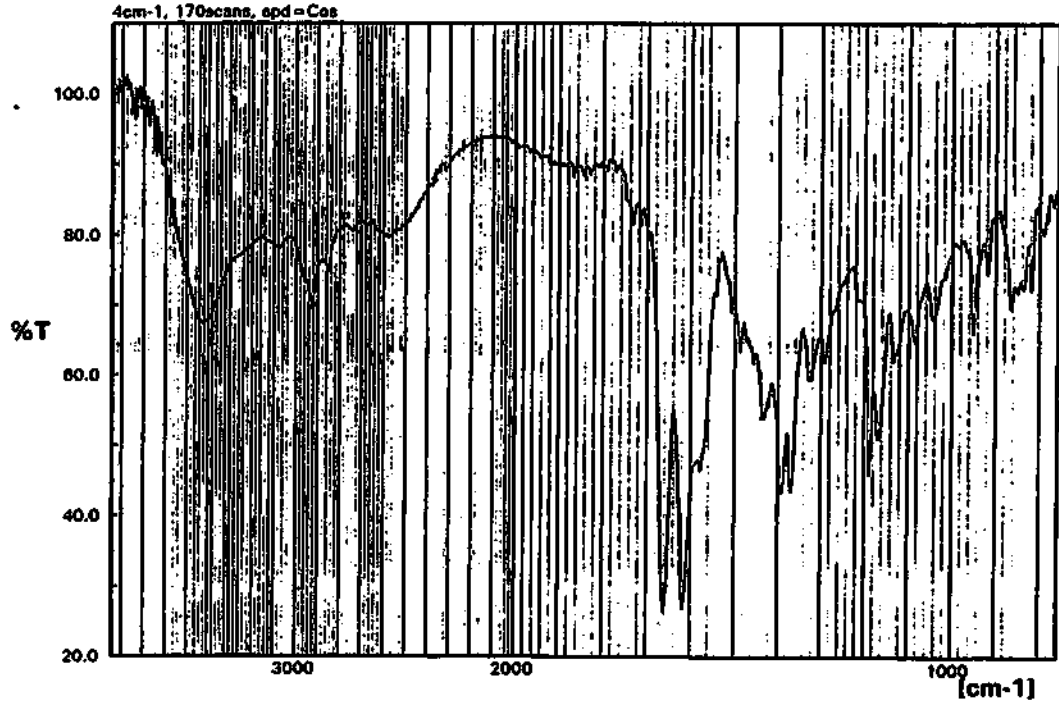
1.4 Spektrum RMI HMBC cassiarin A

1.6 Spektrum RMI NOESY cassiaria A



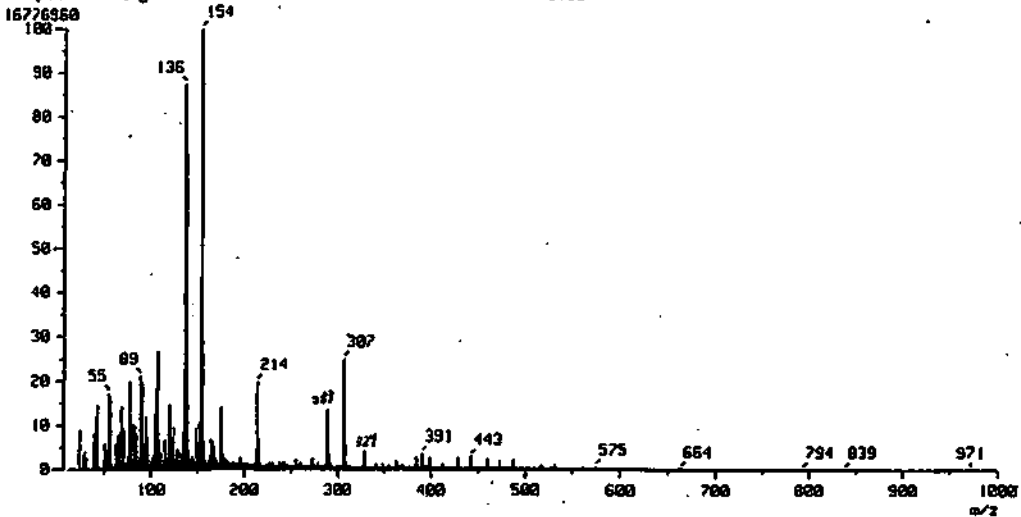
1.5 Spektrum RMI COSY cassiaria A





1.7 Spektrum IR dari cassiarin A

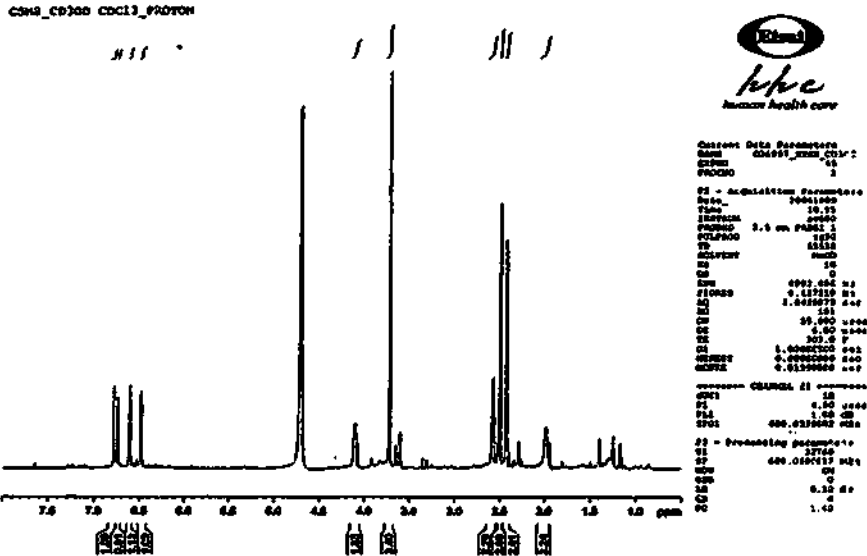
[Mass Spectrum]
 Date : 0611001 Date : 10-Nov-196 09:36
 Sample: CSM53 MeOH NBR
 Note : JMS-SX102A00 NDR-0123-01
 Inlet : Direct Ion Mode : FRB+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 RT : 0.18 min Scan# : 2 Temp : 121.0 deg.C
 BP : m/z 154.0000 Int. : 1589.98
 Output m/z range : 10.0000 to 1000.0000 Cut Level : 0.00 %



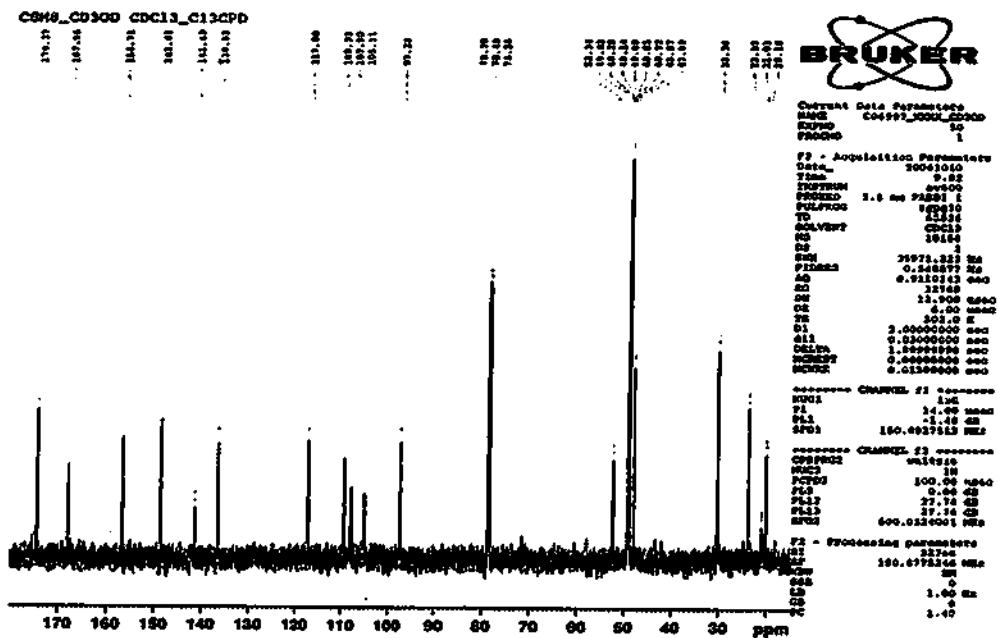
1.8 Spektrum MS cassiarin A

LAMPIRAN 2

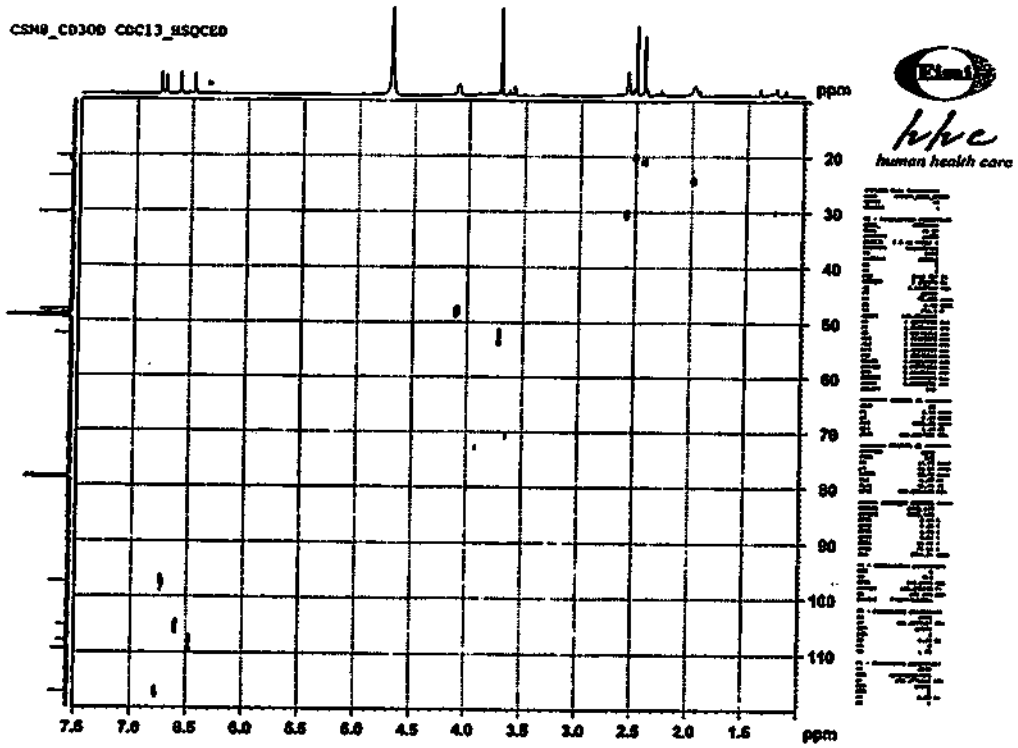
Hasil spektra cassiarin B



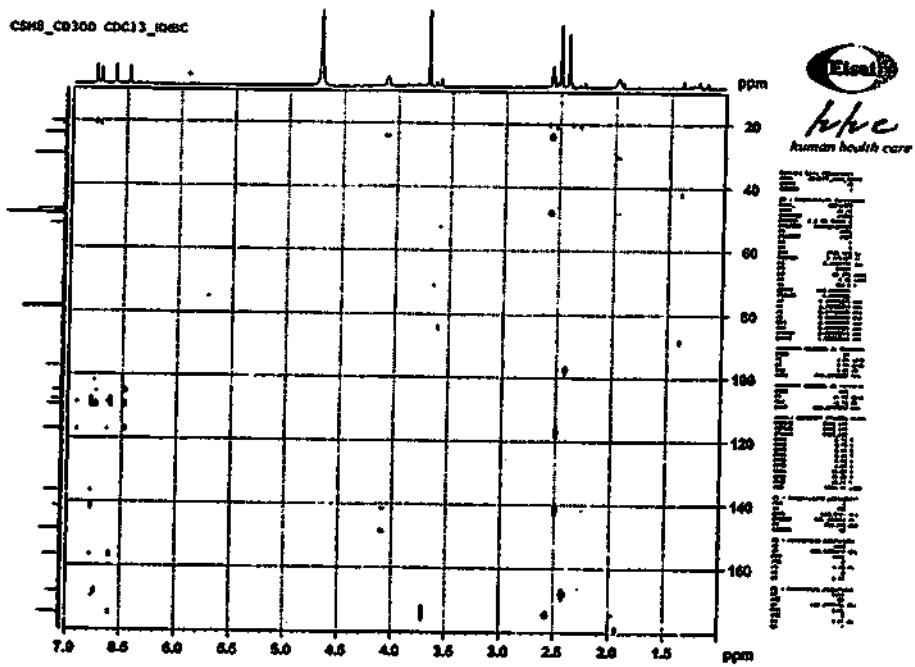
2.1 Spektrum RMI-¹H cassiarin B dalam CDCl₃/CD₃OD



2.2 Spektrum RMI-¹³C cassiarin B dalam CDCl₃/CD₃OD

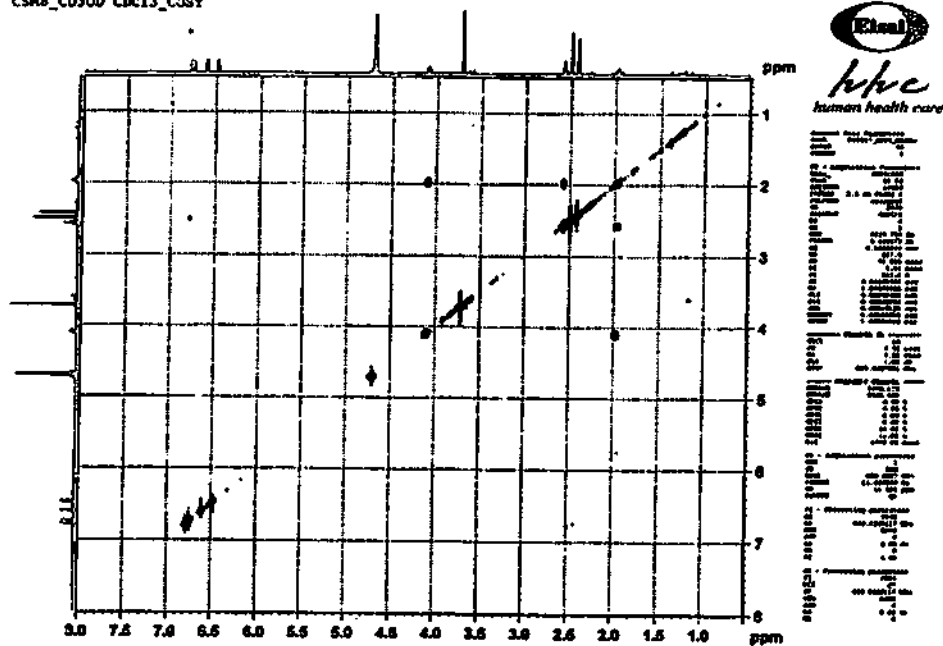


2.3 Spektrum RMI HSQCED cassiarin B



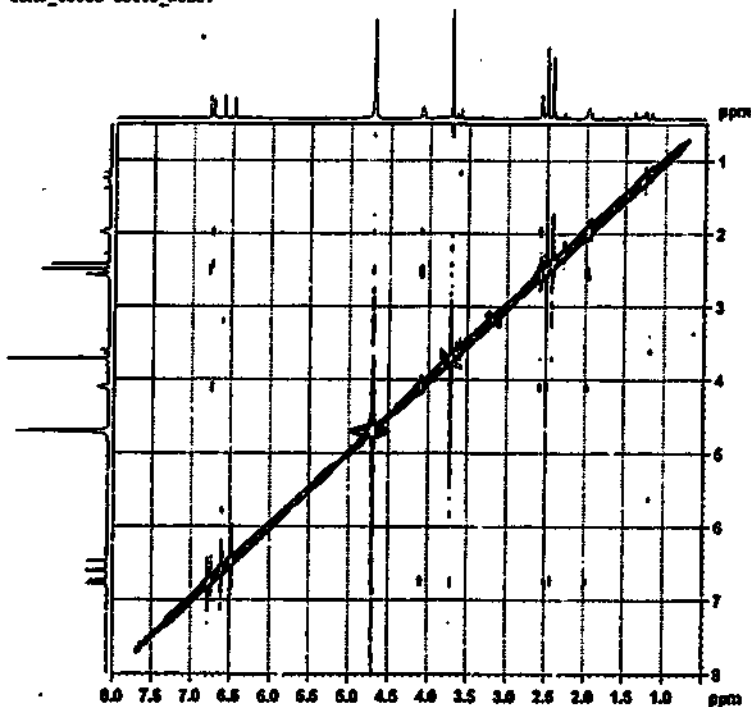
2.4 Spektrum RMI HMBC cassiarin B

CSM8_CD300 CDC13_COSY



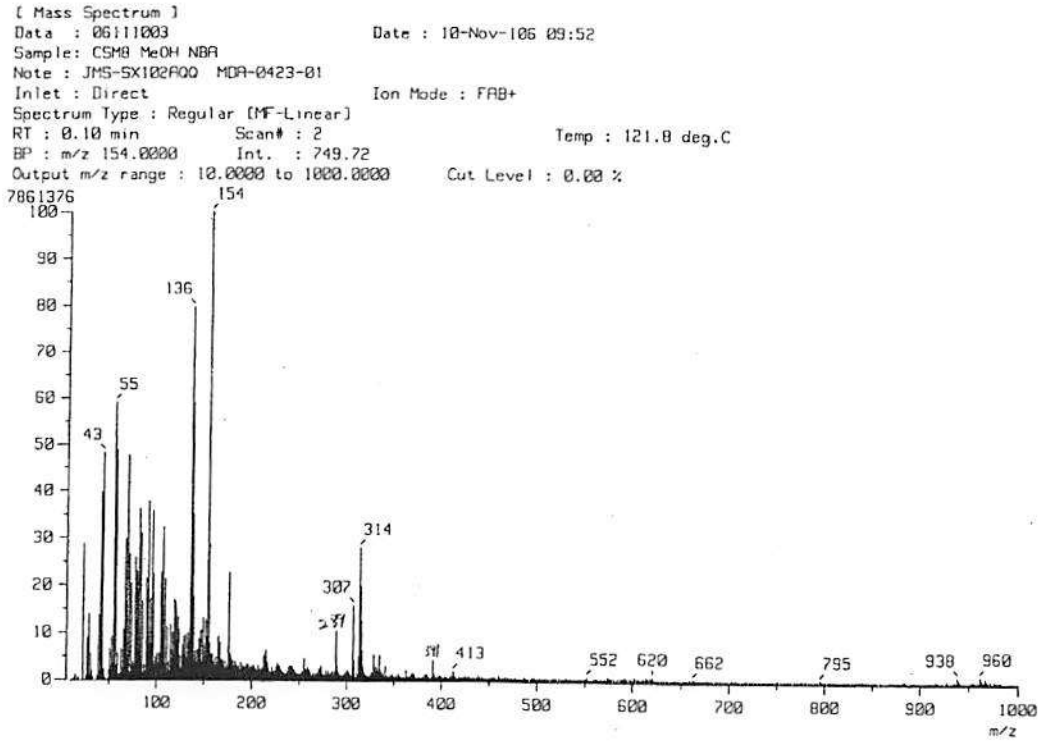
2.5 Spektrum RMI COSY cassiarin B

CSM8_CD300 CDC13_NOESY

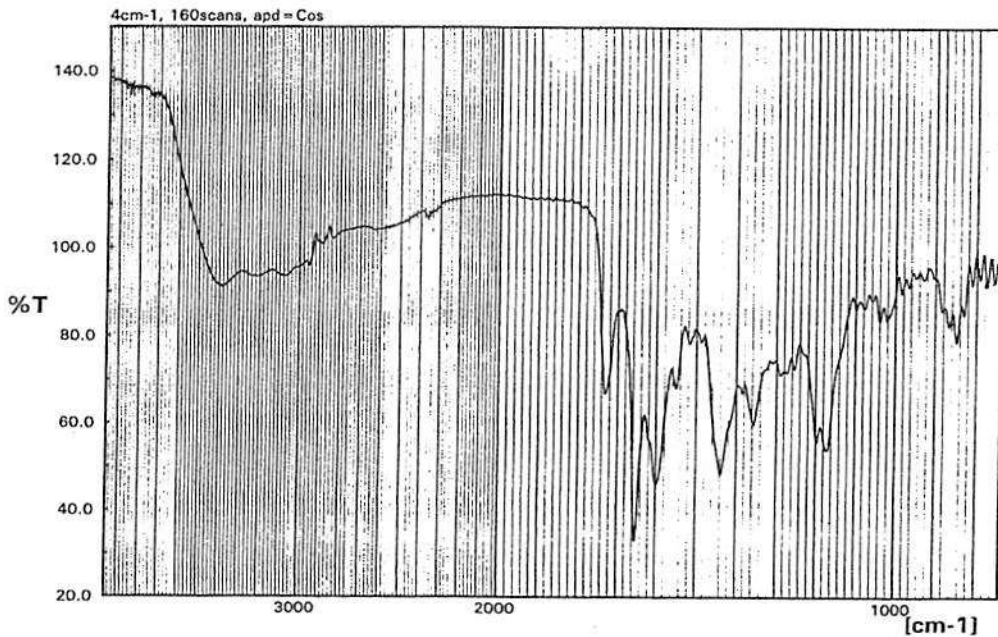


Current Data Acquisition
 Date: 06/17/2004
 Time: 10:10
 Name: CDC13
 P1: 1.00000000
 P2: 0.10000000
 P3: 0.10000000
 P4: 0.10000000
 P5: 0.10000000
 P6: 0.10000000
 P7: 0.10000000
 P8: 0.10000000
 P9: 0.10000000
 P10: 0.10000000
 P11: 0.10000000
 P12: 0.10000000
 P13: 0.10000000
 P14: 0.10000000
 P15: 0.10000000
 P16: 0.10000000
 P17: 0.10000000
 P18: 0.10000000
 P19: 0.10000000
 P20: 0.10000000
 P21: 0.10000000
 P22: 0.10000000
 P23: 0.10000000
 P24: 0.10000000
 P25: 0.10000000
 P26: 0.10000000
 P27: 0.10000000
 P28: 0.10000000
 P29: 0.10000000
 P30: 0.10000000
 P31: 0.10000000
 P32: 0.10000000
 P33: 0.10000000
 P34: 0.10000000
 P35: 0.10000000
 P36: 0.10000000
 P37: 0.10000000
 P38: 0.10000000
 P39: 0.10000000
 P40: 0.10000000
 P41: 0.10000000
 P42: 0.10000000
 P43: 0.10000000
 P44: 0.10000000
 P45: 0.10000000
 P46: 0.10000000
 P47: 0.10000000
 P48: 0.10000000
 P49: 0.10000000
 P50: 0.10000000
 P51: 0.10000000
 P52: 0.10000000
 P53: 0.10000000
 P54: 0.10000000
 P55: 0.10000000
 P56: 0.10000000
 P57: 0.10000000
 P58: 0.10000000
 P59: 0.10000000
 P60: 0.10000000
 P61: 0.10000000
 P62: 0.10000000
 P63: 0.10000000
 P64: 0.10000000
 P65: 0.10000000
 P66: 0.10000000
 P67: 0.10000000
 P68: 0.10000000
 P69: 0.10000000
 P70: 0.10000000
 P71: 0.10000000
 P72: 0.10000000
 P73: 0.10000000
 P74: 0.10000000
 P75: 0.10000000
 P76: 0.10000000
 P77: 0.10000000
 P78: 0.10000000
 P79: 0.10000000
 P80: 0.10000000
 P81: 0.10000000
 P82: 0.10000000
 P83: 0.10000000
 P84: 0.10000000
 P85: 0.10000000
 P86: 0.10000000
 P87: 0.10000000
 P88: 0.10000000
 P89: 0.10000000
 P90: 0.10000000
 P91: 0.10000000
 P92: 0.10000000
 P93: 0.10000000
 P94: 0.10000000
 P95: 0.10000000
 P96: 0.10000000
 P97: 0.10000000
 P98: 0.10000000
 P99: 0.10000000
 P100: 0.10000000

2.6 Spektrum RMI NOESY cassiarin B



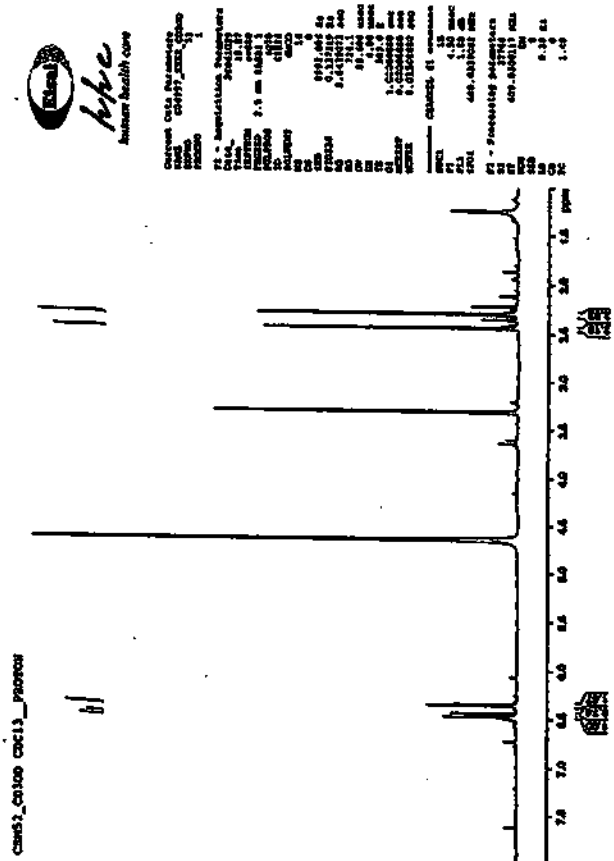
2.7 Spektrum MS cassiarin B



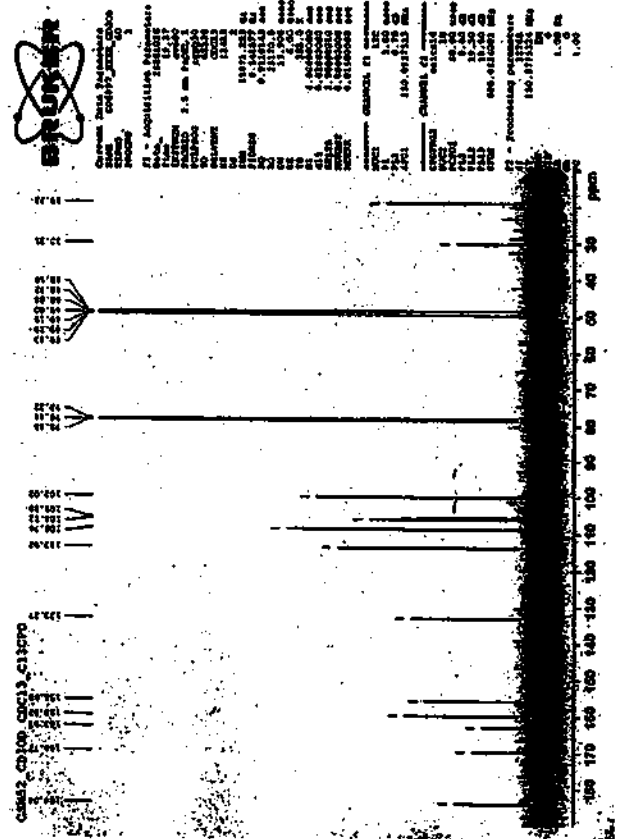
2. 8 Spektrum IR dari cassiarin B

LAMPIRAN 3

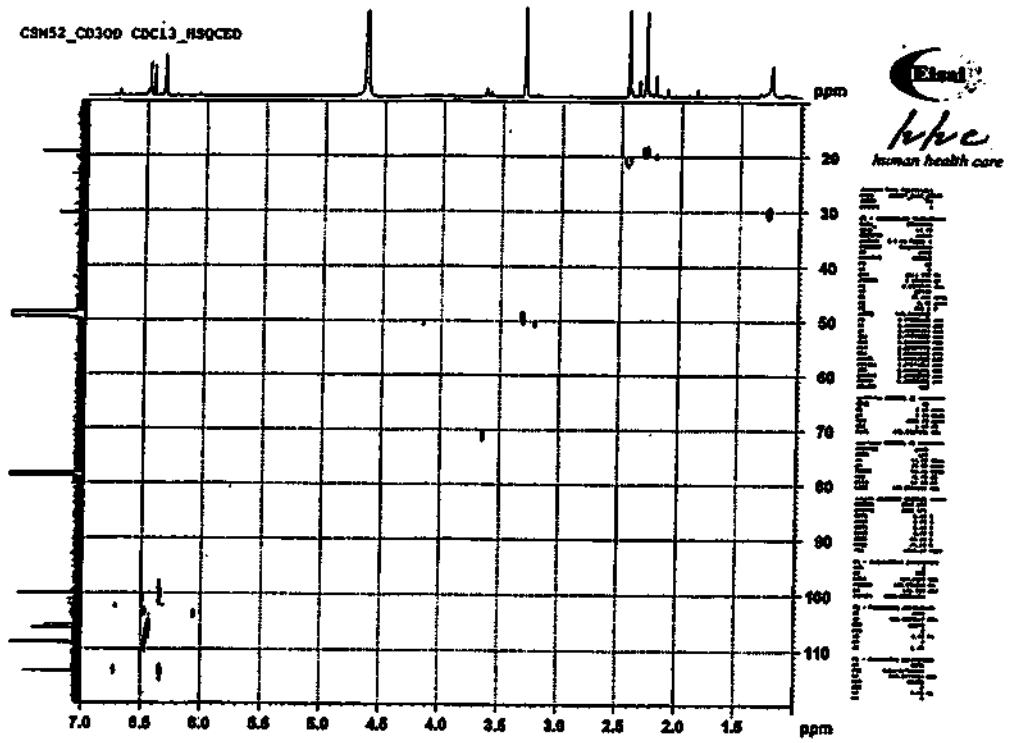
Hasil spektra isolat anhydrobarakol



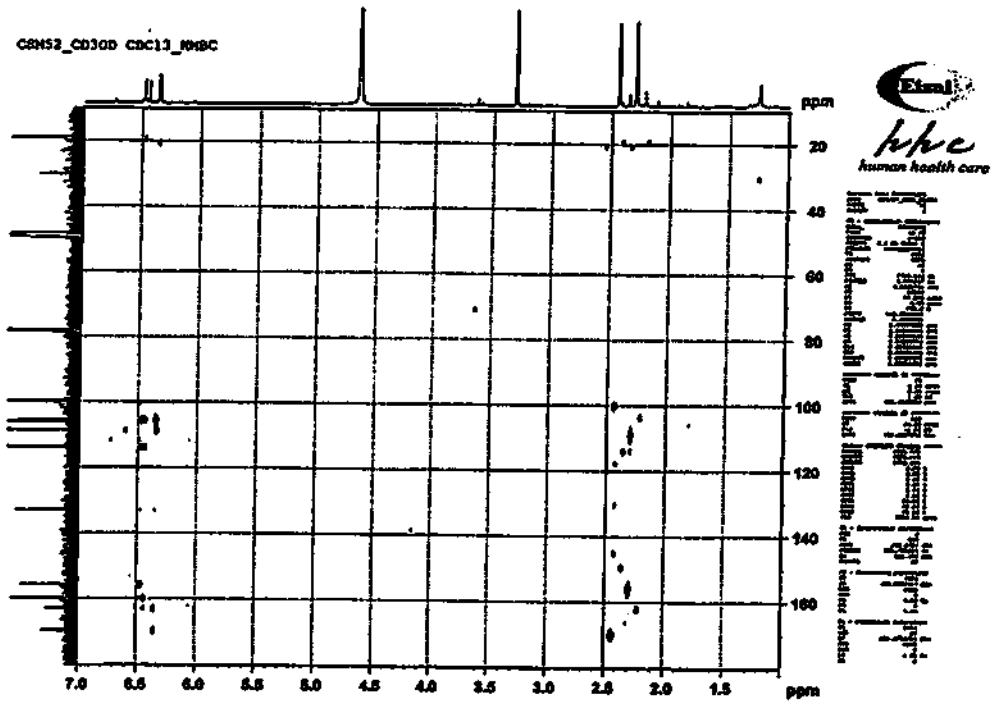
3.1 Spektrum RMI-¹H anhydrobarakol dalam CDCl₃/CD₃OD



3.2 Spektrum RMI-¹³C anhydrobarakol dalam CDCl₃/CD₃OD

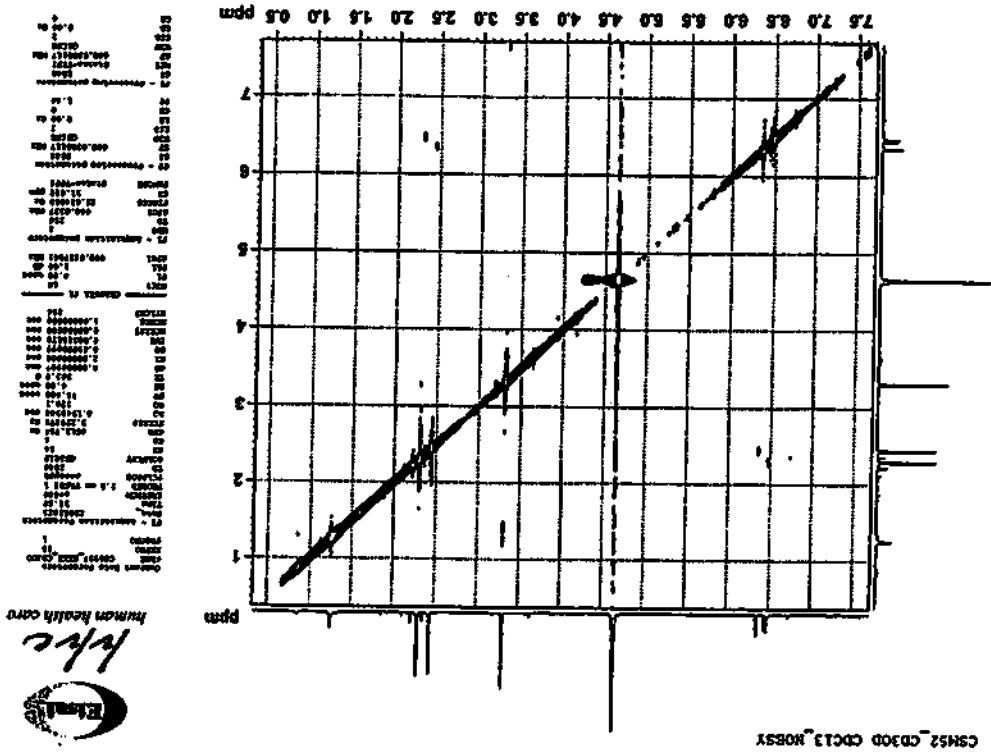


3.3 Spektrum RMI HSQCED anhydrobarakol

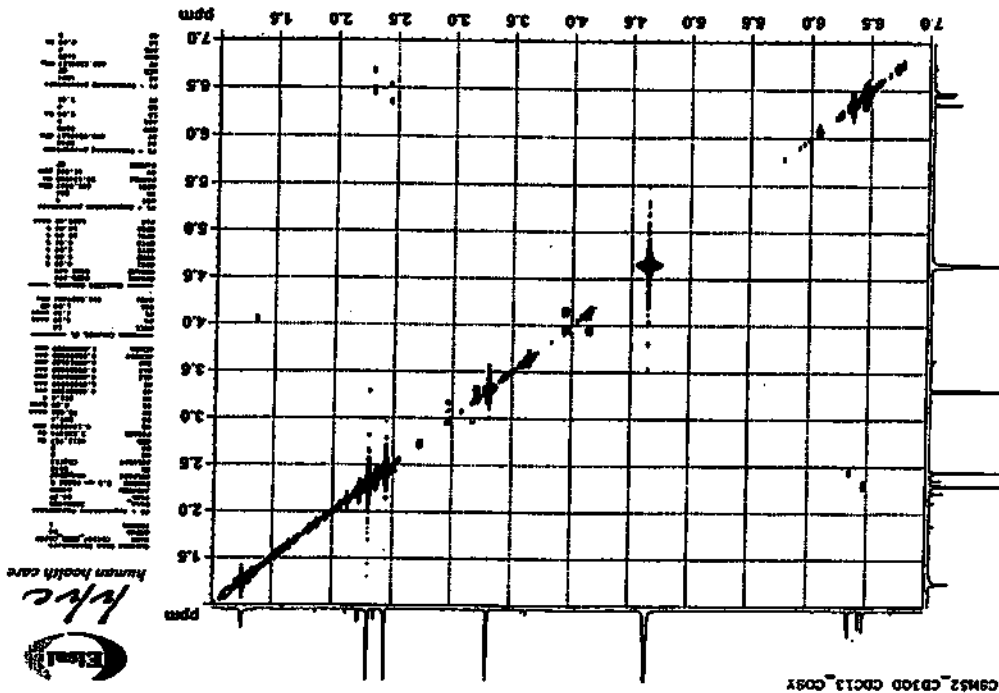


3.4 Spektrum RMI HMBC anhydrobarakol

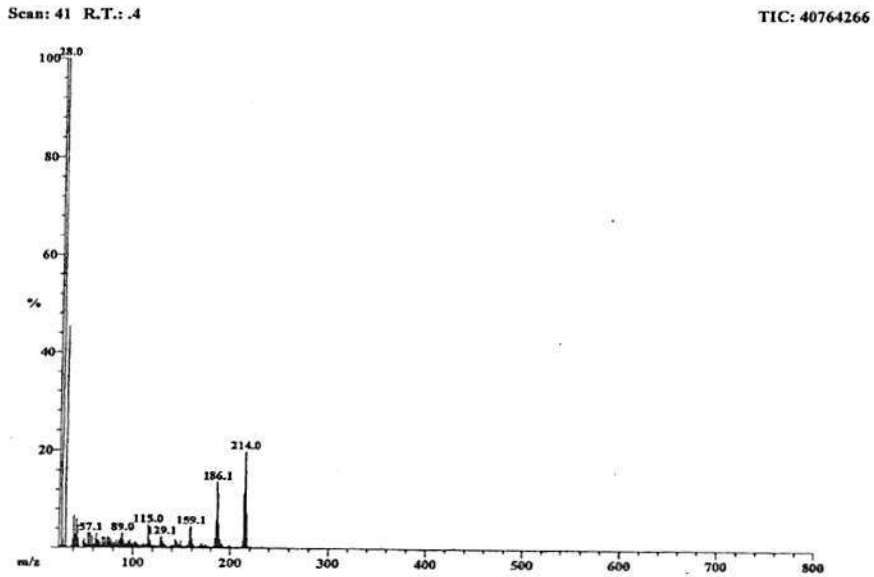
3.6 Spektrum RMI NOESY anhydrobarakol



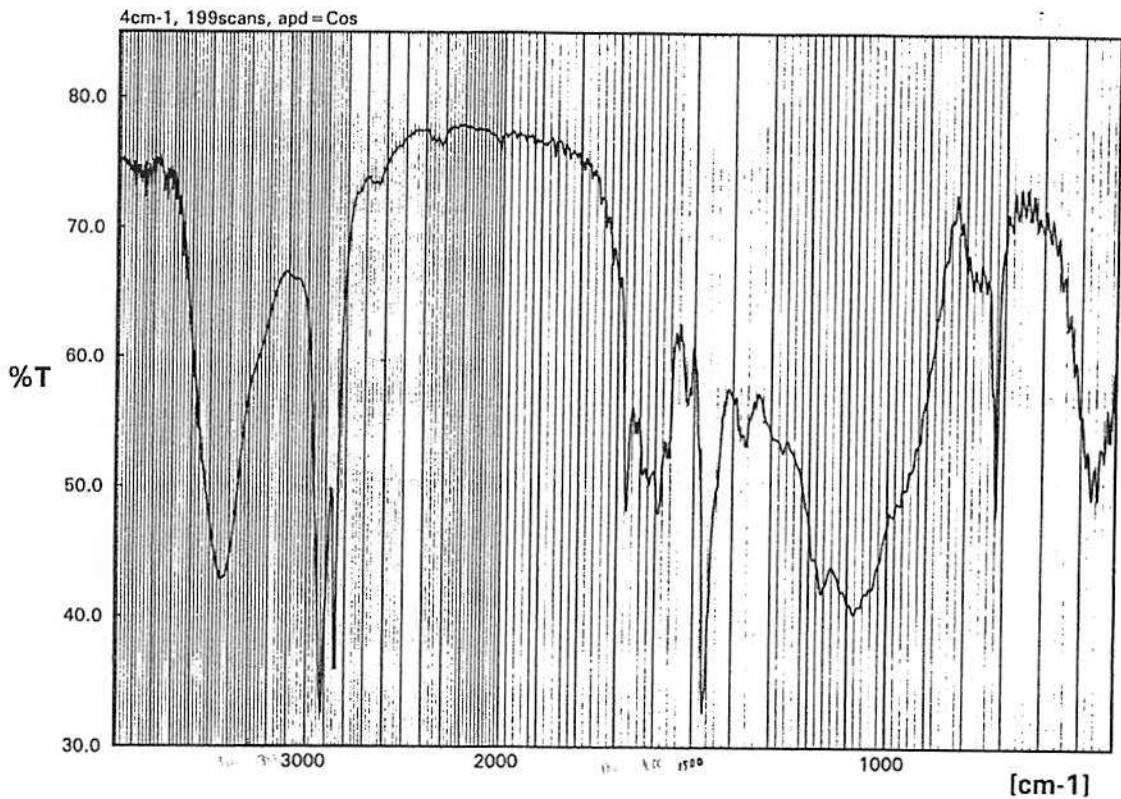
3.5 Spektrum RMI COSY anhydrobarakol



File: 20061108011 Date Run: 11-10-2006 (Time Run: 15:12:52)
 Sample: CSM52 INFO:eel08733_XXXX_C06999
 Instrument: SX102A Ionization mode: EI+



3.7 Spektrum MS anhydrobarakol



3.8 Spektrum IR anhydrobarakol