



**LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2004**

**UJI ANTIMALARIA SENYAWA HASIL ISOLASI FRAKSI POSITIF
ALKALOID DAUN CASSIA SIAMEA PADA BIAKAN IN VITRO
PLASMODIUM FALCIPARUM**

Peneliti:

Dra. Wiwied Ekasari, Apt., M.Si
Dra. Aty Widyawaruyanti, Apt., M.Si
Drh. Suhintam Pusarawati, M.Si.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi
DIP Nomor : 004/XXIII/1/--/2004 Tanggal 3 Januari 2004
Kontrak Nomor : 108/P2IPT/DPPM/DM, SKW/III/2004
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 24.

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2004

ANTIMALARIA
CASSIA

IR PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

LP. 06 / 06
Eka
u



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2004

UJI ANTIMALARIA SENYAWA HASIL ISOLASI FRAKSI POSITIF ALKALOID DAUN CASSIA SIAMEA PADA BIAKAN IN VITRO PLASMODIUM FALCIPARUM

Peneliti:

Dra. Wiwied Ekasari, Apt., M.Si
Dra. Aty Widyawaruyanti, Apt., MSi
Drh. Suhintam Pugarawati, M.Si.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi
DIP Nomor : 004/XXIII/1--/2004 Tanggal 3 Januari 2004
Kontrak Nomor : 108/P2IPT/DPPM/DM, SKW/III/2004
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 24.

0006061A1

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. a. Judul Penelitian	: UJI ANTIMALARIA SENYAWA HASIL ISOLASI FRAKSI POSITIF ALKALOID DAUN <i>CASSIA SIAMEA</i> PADA BIAKAN <i>IN VITRO</i> <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>
b. Macam Penelitian	: Eksperimental Laboratorium
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap dan Gelar	: Dra. Wiwied Ekasari, Apt., MSi
b. Jenis Kelamin	: Wanita
c. Pangkat/Golongan / NIP	: III C/132 087 863
d. Jabatan sekarang	: Lektor
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: Fakultas Farmasi
f. Univ/Inst/Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang ditekuni	: Bahan Alam
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 Orang
4. Lokasi Penelitian	: Fak. Farmasi dan TDC Unair
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka waktu penelitian	: 6 bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 6.000.000 (Enam Juta rupiah)

Surabaya, Desember 2004

Ketua Peneliti

Dra. Wiwied Ekasari, Apt., MSi
NIP. 132 087 863



Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS
NIP. 130 701 125

**UJI ANTIMALARIA SENYAWA HASIL ISOLASI FRAKSI POSITIF
ALKALOID DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA BIAKAN *IN VITRO*
*PLASMODIUM FALCIPARUM***

(Wiwied Ekasari, Aty Widyawaruyanti, Suhintam Pusarawati)
(tahun 2004, 27 halaman)

RINGKASAN

Bangkitnya kembali penyakit malaria menyebabkan pencarian senyawa baru sebagai obat antimalaria baik dari bahan alam maupun hasil sintesis terus dilakukan. Pemakaian bahan alam untuk mengatasi berbagai penyakit telah lama dilakukan. Tanaman sebagai sumber potensial obat antimalaria dimulai dengan ditemukannya kinina, alkaloid yang berasal dari kulit batang *Cinchona* sp, yang dilanjutkan dengan artemisinin dari tumbuhan *Artemisia annua*.

Dari beberapa tumbuhan yang telah berhasil diisolasi senyawa bioaktifnya terhadap *Plasmodium falciparum* diketahui bahwa senyawa alkaloid masih merupakan golongan senyawa yang potensial sebagai antimalaria.

Di Indonesia, salah satu tanaman yang banyak digunakan secara tradisional untuk antimalaria adalah daun *Cassia siamea*. Beberapa penelitian terdahulu tentang aktivitas antimalaria dari tanaman ini telah dilakukan dengan hasil memuaskan. Sebagai lanjutan, maka pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antimalaria dari senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* dengan menentukan harga IC₅₀ nya.

Serbuk daun *C. siamea* yang telah dihilangkan lemaknya, diekstraksi lagi dengan etanol 96% yang mengandung 1% asam tartrat pada suhu kamar. Kemudian dibasakan dengan NH₄OH dan diekstraksi lagi dengan CHCl₃ hingga diperoleh ekstrak CHCl₃ pekat. Terhadap 1 g ekstrak kloroform, dilakukan kromatografi kolom vakum dengan menggunakan fase gerak n-heksana-kloroform-etanol pada berbagai macam perbandingan. Kemudian terhadap 1 g fraksi positif alkaloid hasil kromatografi kolom vakum, dilakukan lagi isolasi kromatografi kolom lambat menggunakan fase gerak dengan kepolaran yang meningkat yaitu heksana-kloroform-etanol. Eluat ditampung setiap 7,5 ml dan hasil tampungan yang positif alkaloid kemudian digabungkan.

Terhadap senyawa hasil isolasi kemudian dilakukan identifikasi golongan alkaloid yang hasilnya memberikan noda jingga pada uji KLT dengan penampak noda Dragendorff. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimalaria dengan menggunakan metode Tregger and Jensen. Untuk membantu kelarutan bahan uji dipakai campuran etanol 96% : DMSO (9:1). Parasit yang digunakan adalah isolat *P. falciparum* A2 dari Myanmar dalam keadaan sinkron pada stadium trofozoit muda bentuk cincin (usia 12 -18 jam), dimana untuk mendapatkannya dipakai larutan sorbitol 5 %.

Perhitungan % penghambatan skizon dilakukan dengan membuat hapusan darah tipis yang diwarnai dengan Giemsa dan kemudian dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi per 5000 eritrosit. Selanjutnya dihitung harga IC_{50} memakai analisa probit. Dari hasil uji antimalaria, diperoleh harga IC_{50} sebesar 0,24 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan klorokuin difosfat sebagai obat standar sebesar 1,03 $\mu\text{g/ml}$. Dari sini dapat dilihat bahwa harga IC_{50} senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* lebih kecil daripada klorokuin difosfat untuk isolat *P. falciparum* A2 dari Myanmar. Dengan demikian senyawa alkaloid daun *C. siamea* ini mempunyai peluang sebagai obat skizontosida baru.

Karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penentuan struktur senyawa alkaloid ini sehingga nantinya senyawa ini dapat benar-benar dikembangkan dan diteruskan menjadi obat antimalaria, yang diharapkan dapat mengganti obat-obat antimalaria yang tidak atau kurang efektif lagi dalam menanggulangi penyakit malaria.

ABSTRACT

One of the effort to fight malaria is looking for new antimalarial drugs, which could be started by looking for plants that are traditionally used as antimalarial herbs and *Cassia siamea* is one of the herbs used in Indonesia as antimalarial drug.

This research was done to know the antimalarial activity of alkaloid isolated from *C. siamea* leaves. The result of *in vitro* antimalarial activity of alkaloid isolated of *C. siamea* leaves against *P. falciparum* A2 from Myanmar was was found to have an $IC_{50} = 0,24 \mu\text{g/ml}$. The research showed that alkaloid isolated of *C. siamea* leaves has higher antimalarial activity.

Keyword : *Cassia siamea*, *Plasmodium falciparum*, alkaloid, antimalarial

KATA PENGANTAR

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

UJI ANTIMALARIA SENYAWA HASIL ISOLASI FRAKSI POSITIF ALKALOID DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA BIAKAN *IN VITRO* *PLASMODIUM FALCIPARUM*

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

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

1. Ketua Lembaga Penelitian Unair yang mendukung dan membantu penelitian ini.
2. Kepala Bagian Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Ditjen Dikti, Depdiknas
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu menyediakan fasilitas dan sarana penelitian
4. Direktur Tropical Diseases Centre Universitas Airlangga, atas sarana dan fasilitas yang diberikan.
5. Dr. Wahjo Dyatmiko yang telah memberikan bimbingan dan konsultasinya.
6. Prof Dr. Yoes Prijatna D. yang telah memberikan bimbingan dan konsultasinya
7. Seluruh Staf Pengajar dan karyawan Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair serta semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Semoga amal ibadah Bapak-bapak , Ibu-ibu dan rekan-rekan diterima Allah SWT.

Kami menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini kurang sempurna, oleh sebab itu tim peneliti mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini menjadi lebih sempurna.

Surabaya, Desember 2004

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
BABI. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Tinjauan tentang <i>Cassia siamea</i>	3
2.1.1. Klasifikasi Tanaman	3
2.1.2. Kandungan Kimia <i>C. siamea</i>	3
2.1.3. Kegunaan <i>C. siamea</i>	4
2.1.4. Penelitian yang telah dilakukan terhadap <i>C. siamea</i>	4
2.2. Tinjauan tentang Malaria	5
2.2.1. Penyakit Malaria dan Permasalahannya	5
2.2.2. Siklus Hidup <i>P. falciparum</i>	6
2.2.3. Morfologi <i>P. falciparum</i>	7
2.3. Tinjauan tentang Metode Uji Antimalaria In vitro	9
2.4. Evaluasi Hasil Uji	9

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1. Tujuan Penelitian	10
3.2. Manfaat Penelitian	10
BAB IV. METODE PENELITIAN	11
4.1. Bahan Penelitian	11
4.1.1. Daun <i>C. siamea</i>	11
4.1.2. <i>P. falciparum</i>	11
4.1.3. Bahan Perbandingan	11
4.1.4. Bahan Kimia	11
4.2. Alat-alat Penelitian	12
4.3. Lokasi penelitian	12
4.4. Prosedur Penelitian	12
4.4.1. Pembuatan Ekstrak	12
4.4.2. Fraksinasi dengan Kromatografi kolom Vakum	13
4.4.3. Isolasi Fraksi positif alkaloid	13
4.5. Prosedur Pembiakan Sinambung <i>P. falciparum</i>	14
4.5.1. Persiapan Medium	15
4.5.1.1. Medium Dasar	15
4.5.1.2. Larutan Sodium Bikarbonat 5 %	15
4.5.1.3. Medium Lengkap atau Medium Plus	15
4.5.1.4. Persiapan Serum	15
4.5.1.5. Medium Biak (RP-HS)	15
4.5.2. Persiapan Eritrosit	16

4.5.3. Prosedur Biakan	16
4.5.4. Sub-Biakan	17
4.5.5. Sinkronisasi Biakan <i>P. falciparum</i>	17
4.6. Uji Aktivitas Antimalaria In vitro	18
4.7. Evaluasi Hasil Uji Efek Antimalaria	18
4.8. Analisa data	18
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	19
5.1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi Daun <i>C. siamea</i>	19
5.2. Hasil Identifikasi Secara KLT	20
5.3. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria	21
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	24
DAFTAR PUSTAKA	25

DAFTAR GAMBAR

	8
Gambar 2.1. Morfologi <i>P. falciparum</i>	11
Gambar 4.1. Daun Tanaman <i>Cassia siamea</i>	14
Gambar 4.2. Skema isolasi senyawa alkaloid daun <i>C. siamea</i>	
Gambar 5.1. Kromatogram hasil KLT senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun <i>C. siamea</i> dengan penampak noda Dragendorff	21

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Jumlah eritrosit yang terinfeksi <i>P. falciparum</i> dalam setiap 5.000 eritrosit dan % penghambatan dari senyawa hasil isolasi fraksi alkaloid daun <i>C. siamea</i>	22
Tabel 5.2. Rata-rata % penghambatan senyawa hasil isolasi fraksi alkaloid daun <i>C. siamea</i> terhadap <i>P. falciparum</i> dalam setiap 5000 eritrosit	23
Tabel 5.3. Hambatan pertumbuhan parasit dari senyawa hasil isolasi fraksi alkaloid daun <i>C. siamea</i>	24
Tabel 5.4. Hasil perhitungan IC_{50} menggunakan analisa probit	24

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pada sekitar tahun 1950 - 1960, penyakit malaria ini diramalkan akan dapat diberantas dengan adanya pencanangan WHO untuk pemakaian pestisida seperti DDT guna memberantas vektor nyamuk disamping pemakaian obat-obat antimalaria tentunya. Namun ternyata pada tahun 1987 terdapat laporan bahwa sekitar 103 juta manusia diseluruh dunia terjangkit penyakit ini (Phillipson, 1991) bahkan WHO (1994) juga melaporkan ada 300 sampai 500 juta kasus klinik dari malaria tiap tahun dan menghasilkan kematian 1,5 sampai 2,7 juta kematian . Parasite Rate (PR) di Indonesia sendiri, terutama diluar Jawa-Bali sejak tahun 1984 sampai sekarang belum menunjukkan adanya penurunan. Parasite Rate di luar Jawa-Bali tahun 1984 tercatat sebesar 4,5%, kemudian tahun 1992 sebesar 4,47% dan tahun 1993 meningkat menjadi 5,52% (Dep.Kes.RI, 1994).

Munculnya kembali penyakit ini disebabkan oleh berbagai macam faktor yang kompleks, diantaranya terutama disebabkan adanya resistensi dari *Plasmodium falciparum* terhadap obat antimalaria yang beredar saat ini serta adanya resistensi dari vektor nyamuk *Anopheles* terhadap peptisida seperti DDT. (Phillipson, 1991; Simanjutak, 1995). Hal ini menyebabkan pencarian senyawa baru sebagai obat antimalaria baik dari bahan alam maupun hasil sintesis terus dilakukan.

Tanaman sebagai sumber potensial obat antimalaria dimulai dengan ditemukannya kinina, alkaloid yang berhasil diisolasi dari kulit batang *Cinchona sp.* Di Indonesia , salah satu tanaman yang banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria adalah daun *Cassia siamea* (Johar) dari suku Caesalpiniaceae yang

mempunyai kandungan diantaranya ialah senyawa golongan alkaloid (El Sayyed, 1984).

Beberapa penelitian tentang aktivitas *C. siamea* sebagai antimalaria telah dilakukan. Peneliti telah melakukan uji aktivitas antimalaria daun *C. siamea* secara *in vitro* dengan mengikuti tahapan isolasi alkaloid dan didapat hasil IC_{50} pada masa inkubasi 48 jam sebagai berikut : Ekstrak etanol: 7,06310 $\mu\text{g/ml}$, Fraksi kloroform: 2,40565 $\mu\text{g/ml}$, Fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* : 1,70144 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan harga IC_{50} klorokuin difosfat sebagai obat antimalaria standar adalah :1,03319 $\mu\text{g/ml}$ (Wiwied 2002).

Berdasarkan hal tersebut dapat dilihat bahwa harga IC_{50} fraksi positif alkaloid hampir tidak jauh dengan harga IC_{50} klorokuin difosfat , yang berarti bahwa fraksi ini amat potensial untuk diteruskan. Karenanya pada penelitian kali ini akan dilakukan isolasi fraksi positif alkaloid dari daun ini dan menguji aktivitas antimalariannya, sehingga akan didapat senyawa yang aktif sebagai antimalaria yang dapat menjadi data awal untuk menuju uji manfaat (klinik) pada manusia. Dengan demikian diharapkan dapat ditemukan senyawa bioaktif yang bisa menggantikan obat-obat antimalaria yang tidak/kurang efektif dalam menanggulangi penyakit malaria.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid dari daun *C. siamea* mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro* ?
2. Berapakah harga IC_{50} senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid dari daun *C. siamea* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro* ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TINJAUAN TENTANG TANAMAN *CASSIA SIAMEA*

2.1.1. Klasifikasi tanaman (Backer, 1963)

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak Kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Leguminosae
Suku	: Caesalpiniaceae
Marga	: <i>Cassia</i>
Jenis	: <i>Cassia siamea</i>

Nama daerah : Johar, Juwar (Heyne, 1987)

2.1.2. Kandungan kimia *Cassia siamea*

Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman *Cassia siamea* antara lain : (Harboune, 1971; El-Sayyed, 1984; Biswas, 1986)

- * Daun : triterpenoid, alkaloid inti isokuinolin (siaminin) , senyawa golongan antrakuinon (dioxapenalen, krisofanolantron)
- * Kayu/batang : tanin, antrakinon, lignin, pentosa hidrosianat
- * Bunga : senyawa alkaloid inti kromon, yaitu cassia denindihidroisokumarin, asam kumarat, sterol

2.1.3. Kegunaan *Cassia siamea*

Daun dari tanaman ini telah lama digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria, menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit. Rebusan dari akar pohonnya dapat digunakan sebagai obat cacing serta bunga dan buahnya sering dipakai sebagai tonikum (Heyne, 1987)

2.2. TINJAUAN TENTANG MALARIA

2.2.1. Penyakit malaria dan permasalahannya

Penyakit malaria telah diketahui sejak jaman Yunani kuno, namun penyebabnya baru diketahui pada abad ke-19, setelah Laveran melihat “bentuk pisang” dalam darah seorang penderita malaria. Kemudian baru diketahui bahwa malaria ditularkan oleh nyamuk yang terdapat di rawa-rawa. Nama malaria berasal dari bahasa Italia “mal’aria” yang berarti udara buruk, karena penyakit ini banyak terdapat di daerah rawa yang berbau busuk (Bruce, 1986 ; Gandahusada 1990).

Penyakit malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit bersel tunggal yaitu protozoa yang termasuk dalam marga *Plasmodium*, yang mempunyai habitat di dalam sel darah merah dan sel hati. *Plasmodium* ini mempunyai 4 spesies yang bersifat parasitik bagi manusia yaitu *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* dan *P. ovale*. Parasit ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk betina marga *Anopheles*. Malaria ditandai dengan gejala klinis yang khas yaitu demam tinggi, menggigil, anemia dan splenomegali. Dari keempat jenis *Plasmodium* tersebut yang paling patogen adalah *Plasmodium falciparum* karena kemampuannya menyerang eritrosit muda dan tua serta memiliki resiko kematian yang tinggi pada individu non-imun (Schlesinger, 1988; Mubin, 1992). Infeksi *P. falciparum* banyak ditemukan di daerah tropik dan sub tropik karena pada suhu kurang dari 20°C siklus hidup plasmodium di

dalam tubuh nyamuk terhambat. Di Indonesia parasit ini tersebar di seluruh kepulauan (Boyd, 1970; Gandahusada, 1990).

2.2.2. Siklus hidup *Plasmodium falciparum*

Siklus hidup semua jenis *Plasmodium* yang menyerang manusia terdiri dari dua fase yaitu fase seksual (sporogoni) dalam tubuh nyamuk betina genus *Anopheles* dan fase aseksual (skizogoni) pada hospes manusia yang terdiri dari dua bagian yaitu skizogoni pada sel hati (pra-erythrocytic shizogony) atau fase jaringan dan skizogoni dalam sel darah merah (erythrocytic schizogony) atau fase eritrositik (Manson, 1987; Strickland, 1991).

Infeksi diawali dengan masuknya sporozoit ke dalam sel darah merah. Sporozoit dalam waktu 0,5 - 1 jam menghilang dari darah karena parasit tersebut menginvasi sel hati (siklus eksoeritrositik). Terjadinya efek klinis diawali dengan pelepasan parasit dari sel hati disebut dengan merozoit, kemudian menginvasi ke dalam sel darah merah atau retikulosit. Selama parasit didalam sel darah merah dikenal sebagai siklus aseksual (siklus intra-eritrositik). Invasi tergantung pada interaksi reseptor spesifik pada sel darah merah, glikophorin dan merozoit. Ujung anterior merozoit menebal dan mengadakan hubungan dengan membran eritrosit, setelah itu mengalami invaginasi untuk membentuk vacuola yang membungkus parasit kemudian masuk ke dalam eritrositik

Dalam sel darah merah merozoit berkembang menjadi tidak teratur disebut trofozoit. Selama perkembangan parasit mengabsorpsi haemoglobin yang tinggal sebagai pigmen hematim atau hemozoin dan tampak sitoplasma sebagai granula gelap. Kemudian intinya mengalami perbanyakan secara skizogoni menjadi merozoit disebut skizon. Bila skizon matang, eritrosit akan pecah dan melepaskan merozoit, kemudian

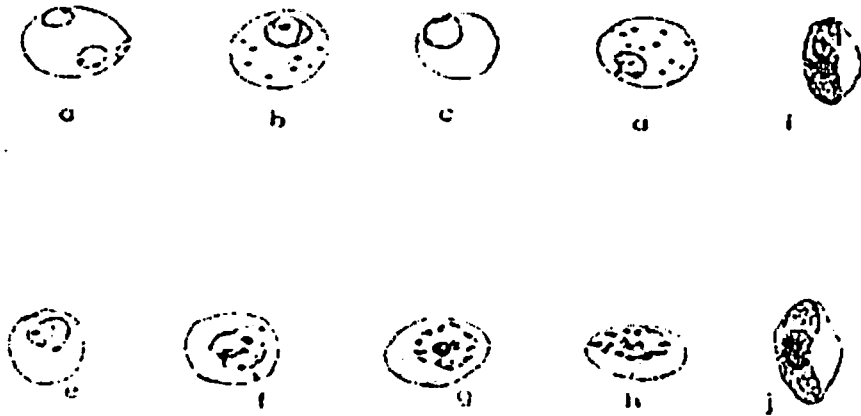
menginvasi sel darah merah baru. Dalam satu siklus *P. falciparum* memerlukan waktu 48 jam (Miller, 1987; Strickland 1991)

Setelah beberapa siklus, merozoit berdeferensiasi menjadi mikrogamet dan makrogamet. Gametosit ini akan masuk ke dalam tubuh nyamuk selama mengisap darah. Dalam tubuh nyamuk parasit mengalami siklus seksual yang akhirnya menghasilkan sporozoit.

2.2.3. Morfologi *Plasmodium falciparum*

Plasmodium ini mempunyai 4 bentuk yaitu :

1. Bentuk cincin, mempunyai diameter kurang lebih 1 μm , tipis, mempunyai nukleus yang berbentuk batang atau terbagi menjadi 2 granul.
2. Bentuk trofozoit, sangat kecil dan halus dengan ukuran \pm seperenam diameter eritrosit
3. Bentuk skizon, ukuran \pm 30 μ pada hari ke-4 setelah infeksi dan skizon mempunyai titik-titik kasar yang tampak jelas (titik Maurer) tersebar pada dua pertiga bagian eritrosit.
4. Gametosit, ada dua macam bentuk gametosit yaitu makrogamet atau gametosit betina dan mikrogamet atau gametosit jantan. Makrogamet biasanya lebih langsing dan panjang dari mikrogamet, sitoplasmanya lebih biru dengan pulasan Romanowsky/giemsma. Intinya lebih kecil dan padat, berwarna merah tua dan butir-butir pigmen tersebar disekitarnya. Mikrogamet berwarna biru lemah atau kemerahan dan intinya berwarna merah muda, besar dan tidak padat, butir-butir pigmen tersebar disitoplasma sekitar inti.



Gambar 2.1. Morfologi *P. falciparum* (Kudo, 1966)

- Keterangan
- a : tiga bentuk cincin dalam eritrosit
 - b : pertumbuhan skizon dalam eritrosit dengan bintang Maurer's
 - c-f : pertumbuhan dan fase skizogoni
 - g-h : bentuk merozoit
 - i : bentuk makrogamet
 - j : bentuk mikrogamet

2.3. TINJAUAN TENTANG METODE UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA

Untuk pengujian antimalaria dari ekstrak tumbuhan dan isolat hasil kolom, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas tehnik dari Rieckmann dkk yang kemudian disempurnakan oleh WHO tahun 1982 (WHO, 1985). Bahan uji dilarutkan dalam DMSO , diencerkan sampai kadar tertentu dalam medium RPMI 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO_3 . Larutan disterilkan dengan saringan diameter 0,45 μm dan diencerkan secara seri. Masing-masing lempeng sumur mikro diisi dengan larutan bahan uji dan ditambahkan 180 μL suspensi 5% eritrosit dengan parasitemia 1 % sehingga masing-masing sumur berisi 200 μL medium yang mengandung serum dan bahan uji yang diteliti. Kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO_2 pada suhu 37^o C selama 48 jam , dan dilakukan evaluasi hasil.

2.4. EVALUASI HASIL UJI ANTIMALARIAL

Setelah diinkubasi selama 48 jam, lempeng sumur mikro dikeluarkan, sediaan uji dicampur sampai homogen dan disentrifuse, filtratnya dibuang dan bagian yang pekat dibuat sediaan lapisan darah tetes tipis dengan 3 kali pengulangan. 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 terhadap pertumbuhan *P. falciparum* terhadap 5.000 eritrosit (Noster, 1990).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN PENELITIAN

TUJUAN UMUM

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.

TUJUAN KHUSUS

Untuk mengetahui berapakah harga IC 50 dari senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.

3.2. MANFAAT PENELITIAN

Dengan diperolehnya data ilmiah mengenai aktivitas senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid dari daun *Cassia siamea*, maka akan dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan senyawa aktif murni yang berkhasiat sebagai antimalaria sehingga didapatkan bahan obat nabati yang dapat menghambat *Plasmodium falciparum*.

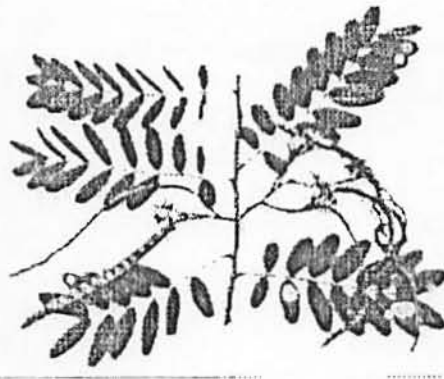
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

4.1.1. Daun *Cassia siamea*

Daun *C. siamea* yang di peroleh dari lingkungan kampus B Universitas Airlangga dan telah dideterminasi di Laboratorium Botani-Farmasi FFUA, diambil secara acak, dicuci dan dikeringkan dengan diangin-anginkan diudara terbuka. Setelah kering daun diserbuk sampai halus.



Gambar 4.1. Daun tanaman *Cassia siamea*

4.1.2. *Plasmodium falciparum*

P. falciparum yang digunakan adalah isolat *P. falciparum* A2 yang diperoleh dari Myanmar dan dikembangkan di TDC Unair Surabaya dengan teknik modifikasi Trager and Jensen. *P. falciparum* yang digunakan untuk uji efektifitas *in vitro* terlebih dahulu disinkronisasi dengan sorbitol 5 %.

4.1.3. Bahan Pembanding

Bahan pembanding adalah klorokuin difosfat

4.1.4. Bahan Kimia

- Untuk isolasi : n-heksana, etanol , kloroform, H₂SO₄, NH₄OH, asam tartrat, toluena, aseton, lempeng KLT silika gel GF 254, silika gel GF 254, HCl, penampak noda Dragendorff

- Untuk uji *in vitro* : air suling, RPMI 1640, HEPES buffer, natrium bikarbonat, gentamisin sulfat, serum manusia, eritrosit manusia, minyak imersi, pewarna Giemsa, dapar fosfat , sorbitol

4.2. Alat-alat Penelitian

Kolom kromatografi, mikropipet, alat-alat gelas, vial, bak kromatografi, laminar air flow (Clean bench – Hitachi), inkubator (Isuzu Incubator Model Z-2195), autoklaf, lemari pendingin, eksikator (candle jar), mikroskop dengan gelas obyek, penyaring membran pipet 0,22 μm , lempeng sumur mikro, botol/flask medium steril, pH meter dan alat-alat tabung sentrifus bertutup.

4.3. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi dan Fitokimia , Bagian Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga untuk isolasi, sedang uji aktivitas dilakukan di Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

4.4. Prosedur Penelitian

4.4.1. Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun *C. siamea* sebanyak 1 kg diekstraksi dahulu dengan pelarut n-heksana untuk menghilangkan lemak-lemaknya, kemudian serbuk dikeringkan kembali sampai bebas n-heksana dan diekstraksi lagi dengan etanol 90% yang mengandung 1% asam tartrat, pada suhu kamar. Hasil ekstrak disaring dan dipekatkan sampai seperempat volume semula dengan rotavapour. Ekstrak kental ini kemudian dibasakan dengan NH_4OH dan diekstraksi kocok dengan kloroform beberapa kali . Hasil ekstrak kloroform kemudian dikumpulkan dan dirotavapour sampai pekat.

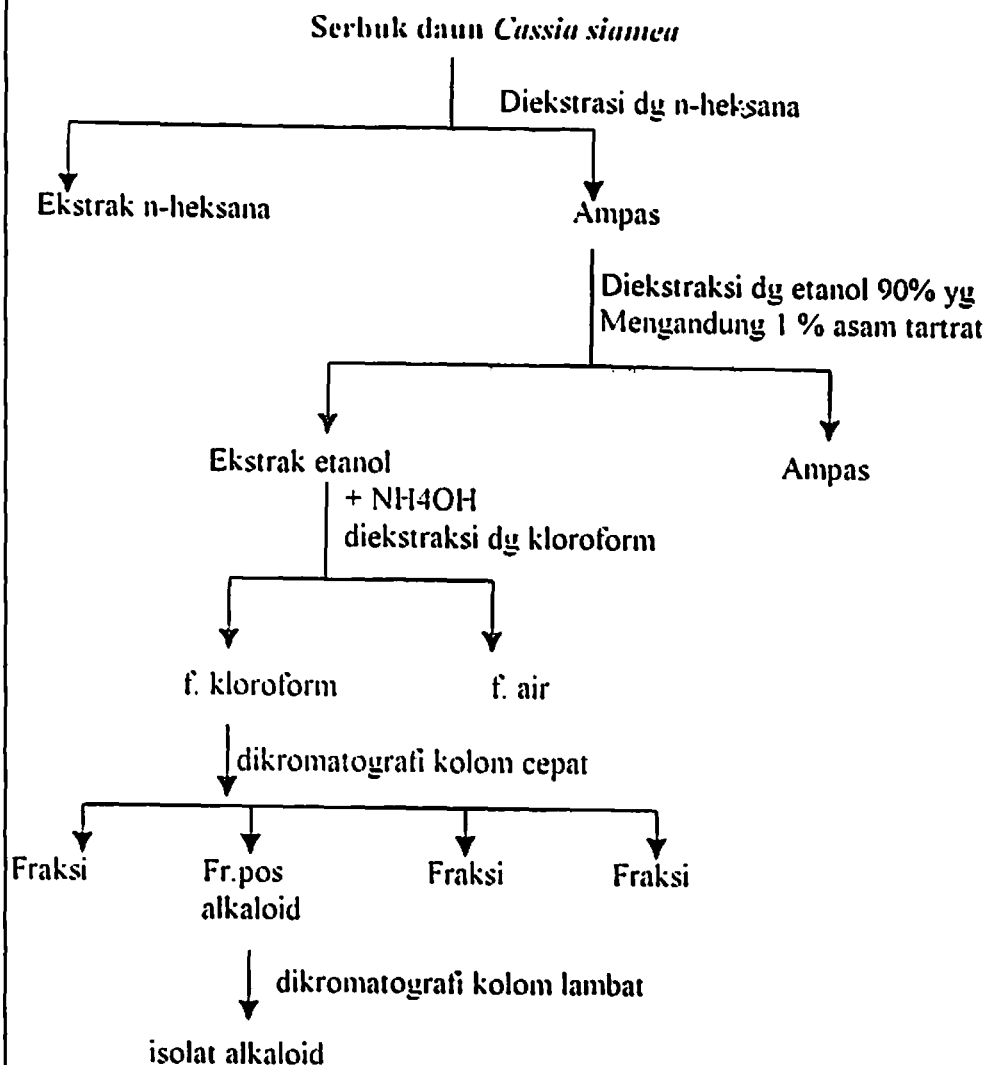
Selanjutnya dilakukan pemisahan pada hasil sari kloroform dengan kromatografi kolom vakum.

4.4.2. Pembuatan Fraksi Alkaloid dengan Kromatografi Kolom Vakum

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 G (E-merck), alat yang digunakan adalah sintered glass yang dihisap dengan pompa vakum. Elusi dilakukan dengan fase gerak yang merupakan campuran dari n-heksana - kloroform - etanol dengan berbagai perbandingan. Fraksi yang positif alkaloid, selanjutnya diisolasi dengan kromatografi kolom lambat.

4.4.3. Isolasi Fraksi yang Positif Alkaloid dengan Kromatografi Kolom Lambat

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60, alat yang digunakan adalah tabung kolom dan pemisahan dilakukan dengan menggunakan fase gerak dengan kepolaran yang meningkat yaitu heksana ; kloroform dan etanol. Ditampung tiap 7,5 ml dan hasil isolasi yang positif alkaloid selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimalarianya.



Gambar 4.2. Skema isolasi senyawa alkaloid dari daun *C. siamea*

4.5. Prosedur Pembiakan Sinambung *Plasmodium falciparum*

P. falciparum dibiakkan secara sinambung dengan teknik modifikasi dari Trager and Jensen (1976). Parasit malaria stadium aseksual hidup didalam eritrosit induk semang. Bila dibiakkan secara *in vitro* berarti parasit juga ditumbuhkan dalam eritrosit manusia ditambah dengan medium sintetik RPMI-1640 yang diberi natrium

bikarbonat dan serum manusia pada lingkungan dengan kadar oksigen rendah dan karbondioksida yang ditinggikan

4.5.1. Persiapan Medium

4.5.1.1. Medium Dasar (RPMI 1640)

Dibuat larutan steril yang terdiri dari 10,4 g RPMI-1640, 5,94g HEPES, 2,5 ml gentamisin (GIBCO 10 mg/ml) dan akuabidest 960 ml serta ditambahkan 1 N NaOH sampai pH mencapai 6,9. Disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22 μ m. Dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4°C. Ini disebut dengan medium minus (M-) dan bila akan digunakan masukkan inkubator suhu 37°C terlebih dahulu.

4.5.1.2. Larutan Sodium bikarbonat 5% w/v

Dibuat larutan sodium bikarbonat 5% w/v dalam air suling, kemudian disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22 μ m, disimpan pada suhu 4°C dan bila akan digunakan dimasukkan dalam inkubator 37°C

4.5.1.3. Medium Lengkap atau Medium Plus (M+)

Medium minus (M-) 100 ml dicampur dengan larutan sodium bikarbonat 5%

4.5.1.4. Persiapan Serum

Diambil darah segar golongan A tanpa koagulan, diletakkan pada temperatur ruang selama 30 menit, disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Serum diambil dengan pipet Pasteur, dan dinaktifasi komplemen pada suhu 56°C selama 30 menit. Penyimpanan pada suhu -20°C dan bila akan digunakan masukkan inkubator pada suhu 37°C.

4.5.1.5. Medium biak (RP-HS)

Medium lengkap (M+) sebanyak 104,2 ml dicampur dengan 11,5 ml serum manusia. Medium ini digunakan untuk membiakkan *P. falciparum*

4.5.2. Persiapan Eritrosit (RBC 50%)

Darah manusia golongan A yang diberi antikoagulan disimpan pada suhu 4°C dapat digunakan tidak lebih dari 3 minggu. Plasma dan *buffy* dibuang dan eritrosit dicuci dengan medium plus (M+) 3-5 volume sebanyak dua kali. Kemudian terakhir dicuci dengan medium komplit + serum manusia (RP-HS). Eritrosit yang telah dicuci ditambah dengan RP-HS dengan volume yang sama untuk membuat RBC 50% dan disimpan pada suhu 4°C. Eritrosit yang telah dicuci dapat digunakan tidak lebih dari satu minggu.

4.5.3. Prosedur Biakan

Biakan dilakukan pada botol kultur dan dikerjakan secara aseptik. Isolat parasit diperoleh dari simpanan beku yang di *thawing* menggunakan metode Meryman.

- *Cryotube* yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37°C. Dipindahkan semua ke tabung sentrifus, kemudian ditambah dengan 1,2 ml NaCl 12 % tetes demi tetes sambil dikocok. ditunggu selama 3 menit pada temperatur ruangan.
- Ditambah 8 ml NaCl 1,6 %, segera diaduk pelan-pelan dan disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm, selama 5 menit pada suhu 4°C.
- Dibuang supernatannya, ditambahkan 3 ml NaCl 1,6% dan disentrifus kembali, terakhir dicuci dengan 3 ml medium RP-HS diulangi 2-3 kali sampai hemolisis tidak terjadi
- Dibuat hapusan darah tipis, dicat dengan giemsa dan diperiksa untuk mengetahui morfologi parasit. Ditambahkan 0,15 ml RBC 50% tiap 0,1% ml *pucked cells* dan medium RP-HS hingga diperoleh hematokrit 2%. Dipindahkan ke botol biak dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 4°C. Ditambah eritrosit baru 0,05 ml

setiap hari ketika mengganti medium sampai hari keempat. Bila hari keempat tingkat parasitemianya lebih dari 2% dapat dilakukan sub-biakan

4.5.4. Sub-biakan

Eritrosit yang terinfeksi disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. *Packed cells* disuspensi dengan RP-HS volume sama untuk membuat suspensi 50%, selanjutnya dibagi-bagi dalam botol kultur yang baru dan ditambah suspensi eritrosit baru (RBC 50%) untuk membuat parasitemia 0,5-1%. Kemudian ditambah RP-HS untuk mendapatkan hematokrit 5-10 % untuk biakan yang sudah beradaptasi dan diinkubasi kembali.

4.5.5. Sinkronisasi Biakan *Plasmodium falciparum*

Untuk uji obat diperlukan parasit dalam keadaan sinkron yaitu stadium cincin/trofozoit umur 12-18 jam. Sinkronisasi dilakukan menggunakan sorbitol 5% (Lambros and Vanderberg, 1979). Adapun tahapannya sebagai berikut :

- Suspensi parasit yang diperoleh dari biakan berkesinambungan dengan tingkat parasitemia 10% (hampir 90% stadium cincin) disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm, selama 5 menit pada suhu 4°C, supernatan dibuang.
- *Paked cells* yang diperoleh disuspensi dengan sorbitol 5% sebanyak 3-4 kali volume *paked cells*, didiamkan selama 5-10 menit pada temperatur kamar, disentrifus dan dibuang supernatannya.
- Dicuci dengan medium RP-HS sebanyak 3-4 kali volume *paked cells*. Pencucian diulangi sampai 3-4 kali.

- Dibuat hapusan tipis dan warnai dengan minyak akridin untuk mengamati morfologi dan dihitung parasitemianya sehingga mencapai 1% dan ditambah medium RP-HS hingga mencapai hematokrit 5%.

4.6. Uji Aktivitas Antimalaria *In-vitro*

Untuk melakukan uji antimalaria *in vitro* diperlukan *P. falciparum* dengan satu fase yang diperoleh dengan cara sinkronisasi. Secara prinsip ujinya adalah sebagai berikut : 20 µl larutan bahan uji dengan berbagai macam kadar dimasukkan ke lempeng sumur mikro, kemudian tambahkan 180 µl suspensi parasit, dan kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37^o C selama 48 jam

4.6.1. Penyiapan Suspensi Sel Parasit

Kadar parasitemia suspensi sel parasit untuk uji antimalaria *in vitro* adalah 1 % . Suspensi sel parasit tersebut dibuat dari biakan *P. falciparum* yang telah disinkronisasi.

4.6.2. Penyiapan Bahan Uji

Sebagai bahan uji adalah ekstrak etanol, ekstrak kloroform, fraksi 16 dan isolat yang dihasilkan dalam proses isolasi daun *C. siamea* dengan konsentrasi 0,05 ; 0,5 ; 5 ; 10 ; 25; dan 50 ppm yang dikerjakan pada kondisi aseptis (O'Neill, 1985)

4.6.3. Pembuatan Larutan Perbandingan Klorokuin Difosfat

Sebagai kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan konsentrasi 0,2 ppm yang setara dengan 4 pmol / 10 µl klorokuin dengan pelarut akuabidest.

4.6.4. Kontrol Negatif

Kontrol negatif adalah pelarut yang dipakai pada bahan uji sebanyak 20 µl

4.7. Evaluasi Hasil Uji Efek Antimalaria

Setelah diinkubasi 48 jam, hasil penelitian dipanen, dibuat sediaan lapisan darah tipis yang dicat dengan giemsa. Selanjutnya dihitung persen penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi terhadap 5.000 eritrosit.

- Parasitemia dihitung dengan rumus :

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

- * Persentase penghambatan dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \left(\frac{X_p}{X_k} \right) \times 100 \%$$

Keterangan :

X_p = Parasitemia perlakuan

X_k = Parasitemia kontrol

4.8. Analisis Data

IC_{50} adalah kadar dimana persen penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* sebesar 50 %. Untuk menentukan nilai IC_{50} digunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (probability unit) persen penghambatan dengan logaritma kadar menggunakan persamaan garis regresi linier (Mursyidi, 1985; Ratsimanaga, 1991; Okpako, 1991).

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

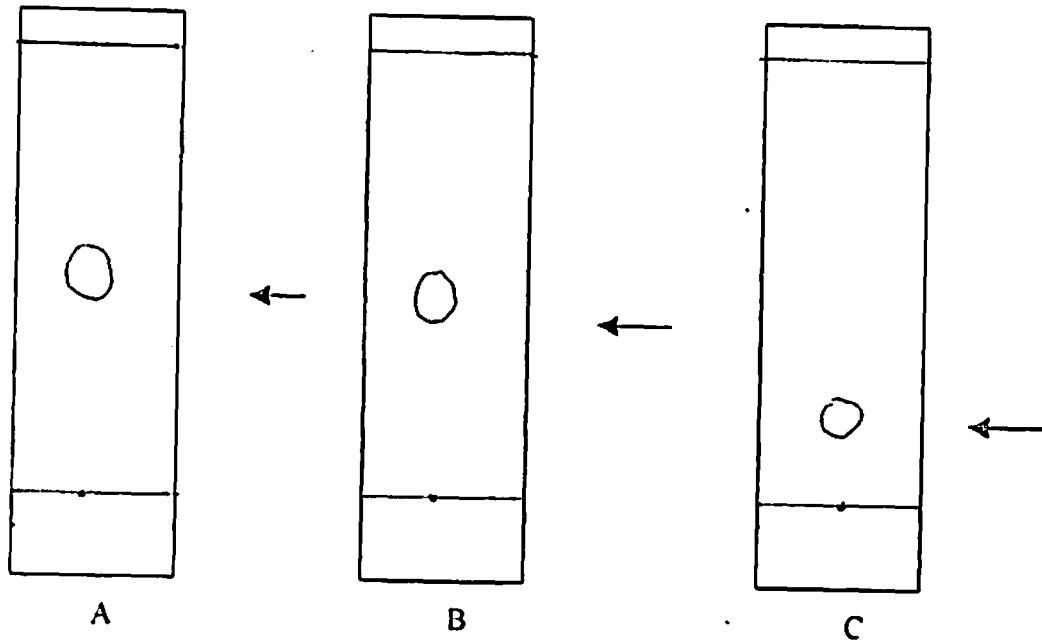
5.1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi daun *Cassia siamea*

Ekstraksi 1,53 kg daun *C. siamea* dengan pelarut n-heksana menghasilkan ekstrak n-heksana seberat 71 g. Kemudian serbuk daun *C. siamea* yang telah diekstraksi tersebut diekstraksi lagi dengan etanol 96% yang telah mengandung 1 % asam tartrat pada suhu kamar. Hasil ekstraksi dirotavapour kemudian dibasakan dengan NH₄OH dan diekstraksi lagi dengan CHCl₃ . diperoleh ekstrak CHCl₃ pekat seberat 79, 75 g.

Terhadap 1 g ekstrak kloroform, dilakukan kromatografi kolom vakum dengan menggunakan fase gerak n-heksana-kloroform-etanol pada berbagai macam perbandingan. Kemudian terhadap 1 g fraksi yang positif alkaloid hasil kromatografi kolom vakum .. dilakukan lagi isolasi kolom kromatografi lambat menggunakan fase gerak dengan kepolaran yang meningkat yaitu n-heksana-kloroform-etanol. Eluat ditampung setiap 7,5 ml. Hasil tampungan yang positif alkaloid kemudian digabung dan didapatkan seberat 50 mg yang selanjutnya diuji aktivitas antimalarianya.

5.2. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi dengan KLT

Identifikasi senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* dengan berbagai macam fase gerak, menggunakan penampak noda Dragendorff dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.1. Kromatogram senyawa hasil isolasi daun *C. siamea* dengan bermacam-macam fase gerak menggunakan penampak noda Dragendorff.

Keterangan gambar :

- A. KLT dengan fase gerak : etilasetat : metanol : air = 100 : 13,3 : 10 ($R_f = 0,57$)
 B. KLT dengan fase gerak : CHCl_3 : etilasetat : metanol = 2 : 2 : 1 ($R_f = 0,51$)
 C. KLT dengan fase gerak : CHCl_3 : etanol = 9 : 1 ($R_f = 0,21$)

5.2. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria

Hasil pengamatan terhadap aktivitas penghambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* dari senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* dapat dilihat sebagai berikut :

Tabel 5.1. % Parasitemia Senyawa Hasil Isolasi Fraksi Positif Alkaloid Daun *C. siamea* Terhadap Pertumbuhan *Plasmodium falciparum*

Dosis	Replikasi	% Parasitemia	Rata-rata % Parasitemia
0,05	1	0,630	0,649
	2	0,691	
	3	0,627	
0,5	1	0,525	0,516
	2	0,517	
	3	0,507	
5	1	0,155	0,140
	2	0,122	
	3	0,145	
10	1	0,047	0,047
	2	0,055	
	3	0,038	
25	1	0,025	0,026
	2	0,028	
	3	0,025	
50.	1	0,016	0,017
	2	0,015	
	3	0,019	

Tabel 5.2. Rata-rata % Penghambatan Senyawa Hasil Isolasi Fraksi Positif Alkaloid Daun *C. siamea* Terhadap *P. falciparum* dalam setiap 5000 eritrosit

No.	Konsentrasi Bahan Uji	% Penghambatan
1.	0,05 ppm	35,02
2.	0,5 ppm	48,35
3.	5 ppm	85,91
4.	10 ppm	95,34
5.	25 ppm	97,41
6.	50 ppm	98,34

Kemudian dari hasil diatas selanjutnya digunakan untuk memperoleh nilai IC_{50} dengan analisa probit yang hasilnya sebagai berikut :

Tabel 5.4. Hasil perhitungan IC_{50} dengan menggunakan analisa probit.

Bahan Uji	Harga IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Isolat alkaloid daun <i>C. siamea</i>	0,24

Uji aktivitas malaria pada penelitian ini dilakukan pada fase aseksual eritrositik, yaitu untuk mengetahui kemampuan bahan uji dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* stadium skizon secara *in vitro*. Hal ini berarti bila suatu bahan uji aktif ditambahkan pada kultur media, maka proses maturasi dari parasit menjadi terhambat/tidak sempurna. Obat

antimalaria diharapkan dapat bereaksi terutama pada tahap eritrositik dalam siklus hidup manusia, karena hanya fase aseksual eritrositik (skizogoni) *P. falciparum* yang memproduksi efek klinis yang berat dan menakutkan yang bahkan dapat berakhir dengan kematian.

Berdasarkan penelitian terdahulu (Wiwied, 2003) diketahui bahwa harga IC_{50} dari ekstrak etanol daun *C. siamea* : 7,06 $\mu\text{g}/\text{m}$. Ekstrak kloroform daun *C. siamea* : 2, 41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan Fraksi 16 daun *C. siamea* : 1,70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. sedangkan IC_{50} senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid menggunakan kromatografi kolom lambat menjadi sebesar 0,24 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ini menunjukkan bahwa senyawa alkaloid dari daun *C. siamea* mempunyai aktivitas antimalaria yang poten. Jika dibandingkan dengan harga IC_{50} dari klorokuin difosfat sebagai obat standart sebesar 1,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ maka menunjukkan bahwa harga IC_{50} senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* lebih kecil daripada klorokuin difosfat untuk isolat *P. falciparum* A2 dari Myanmar. Dengan demikian senyawa alkaloid daun *C. siamea* ini mempunyai peluang sebagai obat skizontosida baru.

Diketahui senyawa alkaloid sampai saat ini masih merupakan golongan senyawa yang potensial dipakai sebagai antimalaria. Karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penentuan struktur senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea* ini sehingga nantinya senyawa ini dapat benar-benar dikembangkan dan diteruskan menjadi obat antimalaria, yang diharapkan dapat mengganti obat-obat antimalaria yang tidak atau kurang efektif lagi dalam menanggulangi penyakit malaria

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- Senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*
- Harga IC_{50} senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* adalah sebesar 0,24 $\mu\text{g/ml}$.

7.2. Saran:

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penentuan struktur senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea* ini sehingga nantinya senyawa ini dapat benar-benar dikembangkan dan diteruskan menjadi obat antimalaria, yang diharapkan dapat mengganti obat-obat antimalaria yang tidak atau kurang efektif lagi dalam menanggulangi penyakit malaria

DAFTAR PUSTAKA

- Arbani PR, 1991. Rencana pemberantasan malaria di Indonesia menjelang tahun 2000. Kumpulan Makalah Simposium Malaria, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 9 – 36
- Backer CA and Backhuizen, 1963. *Flora of Java, Spermatophyta Only*. Walters Noordhoff N.V. Groningen, Nederlands, pp. 539 - 540
- Barnwell J.W and Galinski M.R, 1998. Invasion of Vertebrate Cells : Erythrocytes. In (Sherman I.W, eds). *Malaria : Parasit Biologi, Pathogenesis, and Protection*. Washington D.C.: ASM Press, pp. 93 - 112
- Biswas KM, 1986. Cassiadinina Chromon Alkaloid and (+) - 6 - Hidroxymeleni A Dihydroisocoumarin from *Cassia siamea* Lamk. *Phytochemistry*. Vol. 25 : 1727 – 1730
- Boyd MF, 1970. A Comprehensive survey of all aspect of the group of disease from a global sutand point. In *Malariology*, Vol. 1. Philadelphia : W.B. Saunders Company, p. 29
- Bruce L, 1986. *Essential Malariology*. 2nd edition, London : William Heinman Medical Books. pp. 32 – 50
- Daniel WW., 1978. *Biostatistic : A Foundation for analysis in the health sciences*. Seconds edition, New York : John Wiley and Sons. pp. 232 - 241
- Dep.Kes. RI, 1994. *Profil Kesehatan Indonesia*. Pusat Data Kesehatan, Jakarta, hal. 49-50
- Dey PM, Harborne JB, 1991. *Methods in plants biochemistry Vol 6. Assay for bioativity*. London : Academi Press.
- 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
- Evans WC, 1989. *Trease and Evans. Pharmacognosy*. 13th Edition. Bailliere Tibdall : London, . 544-545.
- Gandahusada S, Pribadi W, Ilahude HD, 1990. *Parasitologi Kedokteran*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 125 -155

- Harborne JB, Bouter D, Turner B, 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. London : Academic Press, pp. 262 –263
- Heyne K, 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid 3, Terjemahan Badan Litbang Kehutanan, Jakarta : hal. 926 - 927
- Hoffman SL et al. 1984. Prolonged incubation improves the micro-scale in-vitro test for drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *The Lancet* 7 (1) : 7-9
- Klayman DL, 1985. Quighaosie (Artemisinin) an antimalarial drug from China. *Science* 228 : 1049 - 1055
- Kudo RR., 1966. *Protozoology*. Illionis :Spring Field comp. p. 717-737
- Lambros C and Vanderberg JB, 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage in culture. *The Journal of Parasitology* 3 : 418 – 421
- Manson Barh PEC and Bell DR, 1987. *Malaria*. In : *Manson's tropical disease*. 19th ed. Bailliere Tindall, pp. 3 - 47
- Miller LH, 1987. *Malaria*. In (Warren KS and Mahmoud AAF. Eds). : *Tropical and geographical medicine*. Singapura : Mc. Graw Hill Book Company , pp. 224 – 238
- Munoz M et al., 1999. Antimalarial activity and cytotoxicity of (-)-Roemrefidine isolated from stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Medica* 65 (5) : 448 - 450
- Mursyidi A, 1984. *Statistika farmasi dan biologi*. Jakarta : Ghalia Indonesia, hal. 57 - 72
- Noster S and Kraus LJ, 1990. In vitro antimalarial activity of *Cautarea latiflora* and *Exostema caribaenum* extrac on *Plasmodium faliparum*. *Planta Medica* 56 (1) : 63 – 65
- Okpako DT, 1991. *Principles of pharmacology, a tropical approach*. Cambridge University Press, pp. 51 -56
- O'Neill MJ et al., 1985. Plants as sources of antimalarial drugs. Part. I. *In vitro* test methods for the evaluation of crude extracts from plants. *Planta Medica* 51 (2) : 394 -398
- Phillipson JD and Wright CW, 1991. Antiprotozoal agents plant sources. *Planta Medica* 57 (1) : 53 - 59
- Ratsimamanga-Urveg S et al., 1991. Antimalarial activity and cytotoxicity of *Ficus pyrifolia* and *Rhus taratana* leaf extracts. *Phytoter. res* 5 (1): 32- 4

- 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
- Robinson T. 1983. *The Organic Constituents of Higher Plants*. 5 th. Edition. Massachusetts : Cordus Press. Hal : 4-6
- Schlesinger PH, Krogstad DJ, Herwaldt BL, 1988. Antimalarial agents : mechanisms of action. *J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* June : 793-798
- Simanjutak P, 1995. Tumbuhan sebagai sumber zat aktif antimalaria. *Buletin Kesehatan Departemen Kesehatan*. Vol. 23 (2) : 2 - 4
- Steel RGD and Torrie JH, 1980. *Principle and Procedures of Statistics : A biometrical approach*. 2 nd. Ed. New York : Mc. Graw-Hill Book Company, pp. 153-170, 233-335
- Steele JCP et al., 1999. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Medica* 65 (5) : 413-416
- Strickland GT, 1991. Malaria. In : *Hunter's tropical medicine*. 7th Ed. Philadelphia : WB Saunders company, pp. 586 - 617
- Sudarman M dan Radjakmangunsudarso H, 1975. *Cabe puyang warisan nenek moyang*. Jilid kedua. Yogyakarta : PT Karya Wreda : 3, 32, 162
- Trager W. and Jensen JB, 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193 : 673 - 676
- World Health Organization, 1985. Special programme for research and training in tropical disease research . TDR seventh program report. *Malaria* (2). WHO Spec. programme for trop. disease. pp. 2 -13
- Wiwied E, Aty W, Suhintam P, 2002, Daya Skinzontosida Ekstrak Etanol, Ekstrak Kloroform dan Fraksi yang Positif Alkaloid daun *Cassia Siamea* Pada biakan *in Vitro Plasmodium falciparum*, Penelitian Dosen Muda (BBI). Lemlit Unair. Surabaya
- Yeo Ae and Rieckmann KH, 1994. Prolonged exposure of *Plasmodium falciparum* to ciprofloxacin increases anti-malarial activity. *J. Parasitology* 80 (1) : 158 - 160