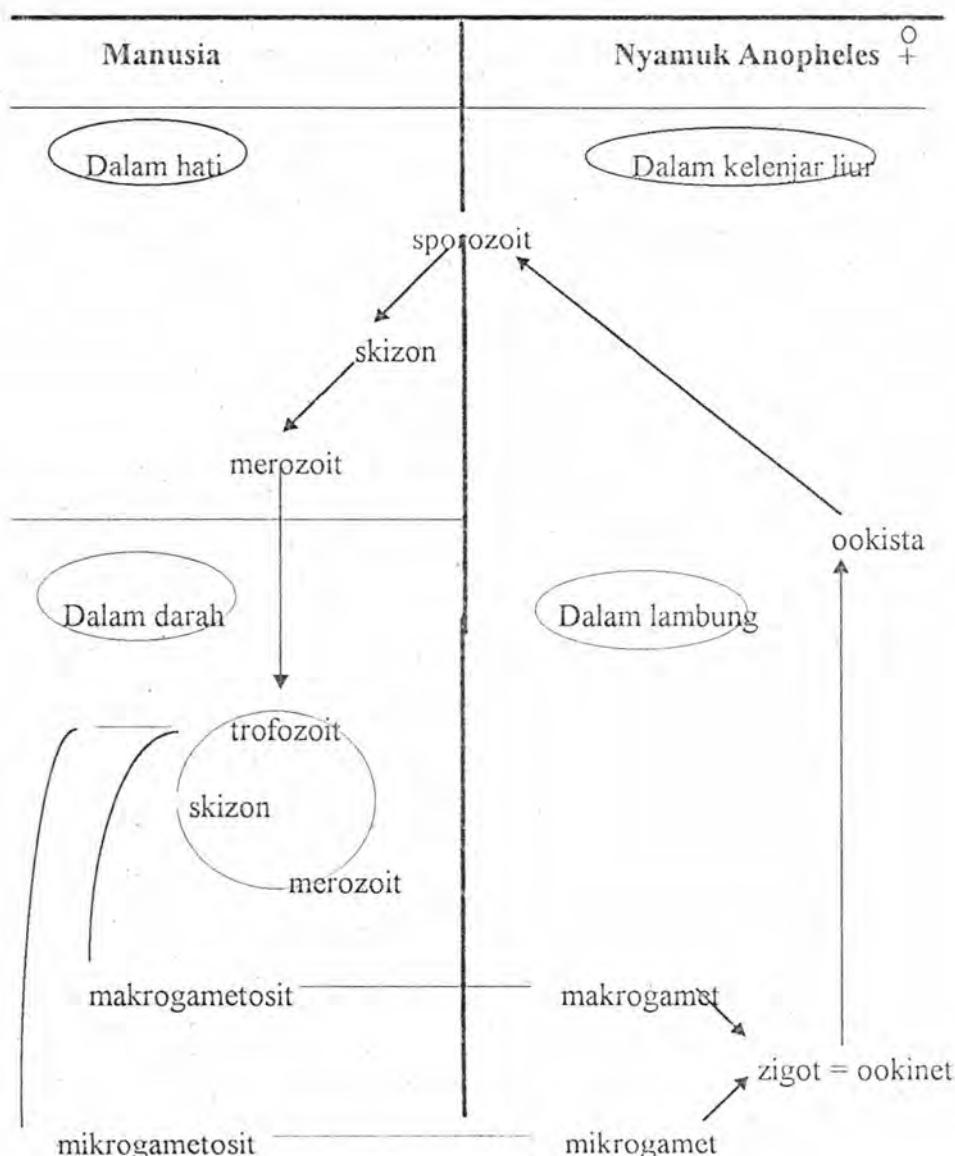


Lampiran : 1



Gambar :2.1. Bagan daur hidup *P.falciparum*
(Sumber : Gandahusada dkk, 1990)

Lampiran ; 2.

Tabel : 2.1 Senyawa antimalaria dari tumbuhan

No	Nama senyawa	Tumbuhan asal	Pustaka
	Senyawa alkaloid		
1	kinina, kinidina	<i>Cinchona</i> sp	Tyler , 1988
2	berberina	Suku Anonaceae,Menispermacae Berberidaceae	Phillipson,1991
3	piknamina	<i>Triclisia patens</i>	Phillipson 1991,Ekong 1991
4	fcantina	"	"
5	aromalina	"	"
6	tiliakorina	<i>Tiliacora triandra</i>	Phillipson, 1991
7	tiliakorinina	"	"
8	nor tiliakorinina A	"	"
9	palmatina	"	Phillipson 1991; Rowe 1989
10	yatrorisina	"	"
11	kolumbamina	"	"
12	protopina	"	"
13	4-metoksi-1 vi nil-β-karbolina	<i>Picrasma javanica</i>	Phillipson 1991
14	usambarensina,	<i>Strychnos usambarensis</i>	Phillipson 1991
15	derivat 3-4-dihidro-usambarina	"	"
16	derivat 18, 19-dihidro-usambarina	"	"
17	vinblastina	<i>Vinca rosea</i>	Phillipson 1991
18	alstonina	<i>Alstonia constricta</i>	Mukherjee 1991
19	ckhitamina	<i>Alstonia scolaris</i>	Mukherjee 1991
20	atalafilinina	<i>Citrus grandis</i>	Phillipson 1991
21	febrifugina (βdikroina)	<i>Dichroa febrifuga</i>	O'Neill dkk 1995, Phillipson, 1991 ,Mukherjee, 1991
22	isofebrifugina (α di klorofebrifugina)	"	"
23	sekurinina	<i>Margaritaria discoidea</i>	Weenen dkk 1990
24	alkaloid pirolisidina $C_{18}H_{25}NO_5^-$	<i>Gynura segetum</i>	Peters 1987
	Senyawa kumarin:		
1	ostrutin	<i>Peucedanum ostruthium</i>	Khalid 1986
2	ostol	"	"
3	5,6,7-trimetoksi kumarin	<i>Diosma pilosa</i>	"
4	4-fenil kumarin	<i>Coutarea latiflora</i> <i>Exostema caribaeum</i>	Noster 1920
5	dafnetin	<i>Daphne spec</i>	Yang Ying-Zi 1992
1	Senyawa lignan justisidin A	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>	Khalid 1986

No	Nama Senyawa	Tumbuhan asal	Pustaka
1	Antranoid vismion D	<i>Psorospermum febrifugum</i> dan flavonoid :	Bray, 1989
1	Khalkon uvaretin,	<i>Uvaria lucida ssp.lucida</i>	Nkunya 1991, & Phillipson 1991
2	diuvaretin	<i>Uvaria schefferi</i>	
3	floridsin		Phillipson 1991
4	Phillipson 1991	<i>Hypericum japonicum</i>	Mukherjee 1991
5	kucrsctin	<i>Diosma pillosa</i>	Khalid 1986
	Terpenoid		
1	artemisinin ("qing haosu")	<i>Artemisia annua L</i>	Vannerstrom 1989, Huang 1990
	artemisinin,	<i>Artemisia apiacea</i>	Woerdenbag 1990
2	1(S)-hidrosibisa bololoksid A	<i>Artemisia arbrotanum</i>	Phillipson 1991
3	partenin	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Phillipson 1991
4	"yingzhaosu"	<i>Artrabotrys uncinatus</i>	Phillipson 1991, Huang 199
5	gosipol	<i>Thespesia populnea (L)</i>	Mukherjee 1991 Peters 1987
6	α -siperon,	<i>Soland ex. Correa</i>	
7	β -selinen	<i>Cyperus rotundus L</i>	Weenen dkk 1990
8	bruscina A,B,C,D	<i>Brucea javanica</i>	Anderson 1991; Pavanand 1986, Guru dkk 1983, O'Neill 1987, Hamburger 1988 Anderson 1989
9	yadansiosida I		
10	ailanton,	<i>Ailanthus altissima</i>	Bray dkk 1987
11	ailantinon		
12	glaukarubinon		
13	glaukarubol		
14	kaparin		
15	sergeolid	<i>Picrolemma pseudocoffea</i>	Fandeur 1985
17	curikomanon	<i>Eurycoma longifolia</i>	Chan dkk 1986
18	curikomalakton		
19	curikomanol		
20	gentiopikrosid	<i>Gentiana macrophylla</i>	Mukherjee, 1991
21	nimbolid	<i>Azadirachta indica</i>	Khalid 1989
22	nimbidiin		Phillipson 1991
23	dihidrogedunin	<i>Melia azedarach, Khaya se negalensis, Citrus aurantium</i>	
24	gedunin		
	atlantin	<i>Atlantia monophylla</i>	Badam, 1988
	Senyawa lainnya		
1	N-isobutil-deka-2,4 dienamida	<i>Zanthoxylum gilletti</i>	Weenen 1990
2	fagaramid		
3	swerkirin	<i>Swertia chirata</i>	
4	β -sesalpinin	<i>Caesalpinia bonducella</i>	Mukherjee 1991
5	garam Zn dari 2-mer-kaptopiridin-N-oksida	<i>Polyalthia nemoralis</i>	

*) Sumber : Broto-Sutaryo, 1994.

Lampiran: 3

Daftar bahan bahan kimia dan pereaksi yang digunakan.

Bahan kimia untuk pemeriksaan pendahuluan..

Air suling	Serbuk magnesium
Eter minyak tanah	Serbuk seng
Metanol	Pereaksi Lieberman-Burchard
Amonia 10%, 25%	Pereaksi Dragendorf
Sodium klorida	Pereaksi Bouchardat
Asam klorida 2 N	Pereaksi Mayer
Sodium hidroksida 1 N	Pereaksi Molisch
Asam sulfat pekat	Pereaksi Stiasni
Asam asetat anhidrat	Fehling A, Fehling B
Sodium asetat	
Kloral hidrat	
Besi (III) klorida	
Antimon (III) klorida	
Kalium hidroksida	

Pelarut untuk pembuatan ekstrak..

Eter minyak tanah teknik
Kloroform teknik
Metanol teknik

Bahan kimia untuk isolasi, pemurnian dan identifikasi.

N-heksana	Etanol
Etil asetat	Kalium bromida
Kloroform	Sodium hidroksida
Metanol	Aluminium klorida
Silika gel 60 (Merck) Art 7733	Asam klorida
Silika gel GF 254 Merck	Sodium asetat
RP 18.	
RP-WF	
Pasir laut	
Kloroform D ₂ = CDCl ₃	
Dimetilsulfoksida D ₆	
Tetrametilsilan (TMS)	

Lampiran : 4

Daftar bahan kimia dan media biak untuk uji in vitro

Air suling

Akuabides

RPMI 1640 (Grand Island Biological), komposisi Moore terdiri atas garam anorganik, asam-asam amino, vitamin sebagai berikut (Moore, 1967)

Garam anorganik :

		Vitamin :	
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O.	100,0	biotin	0,20 mg/L
MgSO ₄	48,84	d-Ca pantotenat	0,25
NaCl	6000,0	kholin HCl	3,00
NaHCO ₃	2000,0	asam folat	1,00
Na ₂ HPO ₄	800,0	l-inositol	35,00
		nikotinamid	1,00
Komponen lain		para amino asam bensoat	1,00
glukosa	2000,0	piridoksin HCl	1,00
Glutathion (reduced)	1,0	riboflavin	0,20
Merah fenol	5,0	tiamin HCl	1,00
		vitamin B12	0,005

Asam-asam amino :

l-arginin (basa bebas)	200,0	mg/L
l-asparagin	50,0	
l-asam aspartat	20,0	
l-sistin	65,0	(2 HCl)
l-asam glutamat	20,0	
l-glutamin	300,0	
glisin	10,0	
l-histidin (basa bebas)	15,0	
l-hidroksipirolin	20,0	
l-isoleusin (bebas allo)	50,0	
l-leusin (bebas metionin)	50,0	
l-lisin HCl	40,0	
l-metionin	15,0	
l-fenilalanin	15,0	
l-prolin (bebas hidroksi l-prolin)	20,0	
l-serin	30,0	
l-treonin (bebas allo)	20,0	
l-triptofan	5,0	
l-tirosin	28,94	(garam Na)
l-valin	20,0	

Dapar HEPES : Asam N-2-hidroksietilpiperasin N'-2-etan sulfonat

Gentamisin sulfat

Sodium bikarbonat (dilanjutkan halaman berikutnya)

Lanjutan lampiran: 4**Daftar media biak (lanjutan)**

Serum manusia

Darah manusia (dari PMI yang sudah kedaluwarsa)

Asam sitrat

Na sitrat

Glukosa

Adenin

Na₂HPO₄

NaH₂PO₄

Sorbitol

Pewarna Giemsa

Zat warna Giemsa dari Lillie (1943) terdiri dari:

Azur B eosinat 500 mg

Azur A eosinat 100 mg

Biru metilen eosinat 400 mg

Biru metilen 100 mg

Metanol p.a. Aseton p.a.

Glicerol p.a. Spiritus dilutus

Sodium klorida Minyak imersi

lemak silikon Lilin parafin murni

Dapar fosfat (buffer) dengan pH 7,2 :

Dibuat larutan stok I terdiri atas : Bisodium fosfat sebanyak 9,5 g dilarutkan ke dalam 1.000 mL air suling sampai homogen. Dibuat larutan stok II terdiri atas: Sodium bifosfat sebanyak 9,2 g dilarutkan ke dalam 100 mL air suling sampai homogen.

Dapar fosfat pH 7,2 dibuat dengan caraencampur 72 mL stok I dengan 28 mL stok II , kemudian ditambah air suling sampai menjadi 1.000 mL.

Larutan Giemsa siap pakai (dibuat baru):

Sebanyak 1 mL larutan stok Giemsa dicampur dengan larutan buffer pH 7,2 sebanya 14 mL. Untuk melihat baik tidaknya, maka diteteskan pada kertas saring,. Bila baik akan terlihat bagian tengah lingkaran warna ungu, bagian luar merah muda

Larutan C.P.D. steril :

Asam sitrat sebanyak 0,327 g, sodium sitrat sebanyak 2,63 g glukosa sebanyak 2,55 g dan bisodium fosfat sebanyak 0,222 g dilarutkan ke dalam air suling menjadi 100 mL. Disterilisasi dalam autoklaf suhu 110° C selama 15 menit

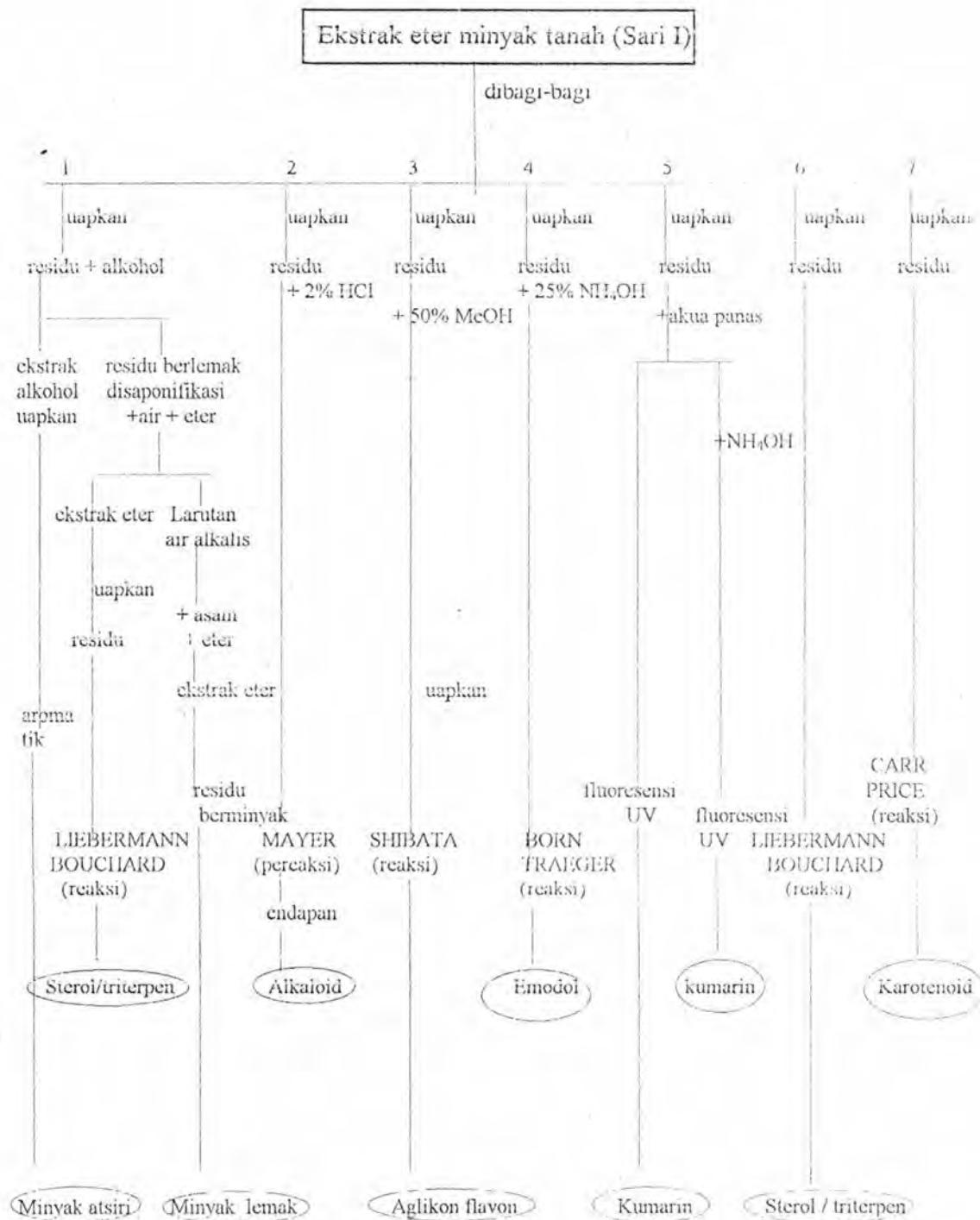
Lampiran : 5.

Daftar alat -alat yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria:

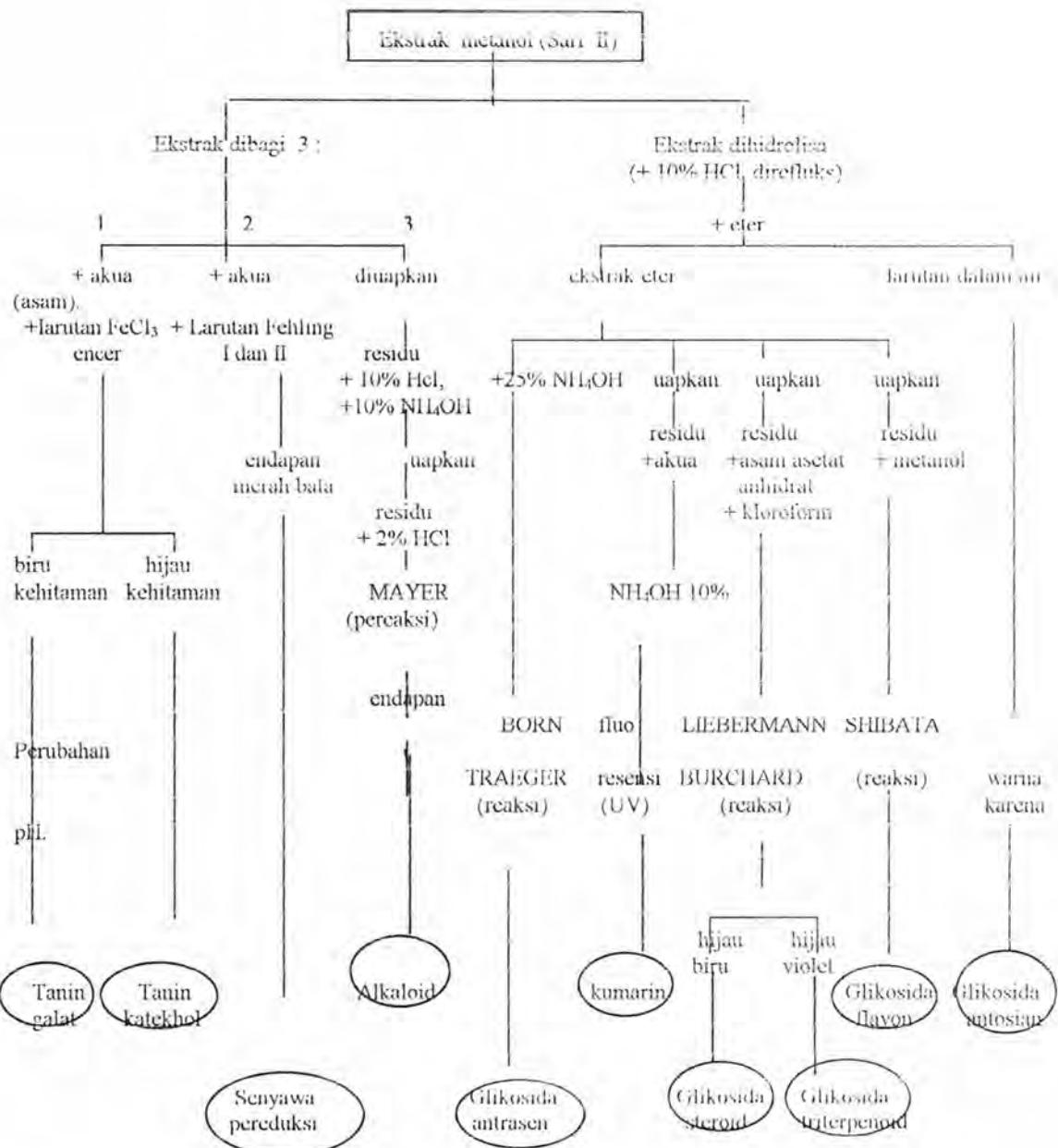
Mikroskop dan perlengkapannya
Laminar air flow cabinet
Inkubator
Timbangan analitik
Timbangan gram
Penangas air
Penangas listrik
Alat rotavapor
Oven
Autoklaf
Lemari pendingin
Desikator dengan keran pada tutupnya
Saringan milipor diameter pori 0.22 um dan 0.45 um
Mikroskop binokuler
Alat sentrifuga
Tabung sentrifuga a 15 ml dengan tutup,
Gelas beker
Labu takar
Gelas Erlenmeyer
Gelas ukur
Cawan petri diameter 60 mm
Botol medium steril
Alat suntik steril 1ml, 10 ml, 20 ml.
Pipet ukur 1 ml, 2 ml, 5 ml
Pipet pasteur
Pipet Eppendorf 10 ul, 50 ul, 100 ul.
Tip untuk pipet Eppendorf kuning, biru,
Slide mikroskop / gelas obyek
Lampu spiritus
Sprayer
Lempeng sumur mikro datar (96 lubang).
Pengaduk magnetik.
Corong gelas
Flakon (vial)
Botol a 100 ml
Pinset
Skalpel
Tang
Gunting
Counter

Lampiran : 6.

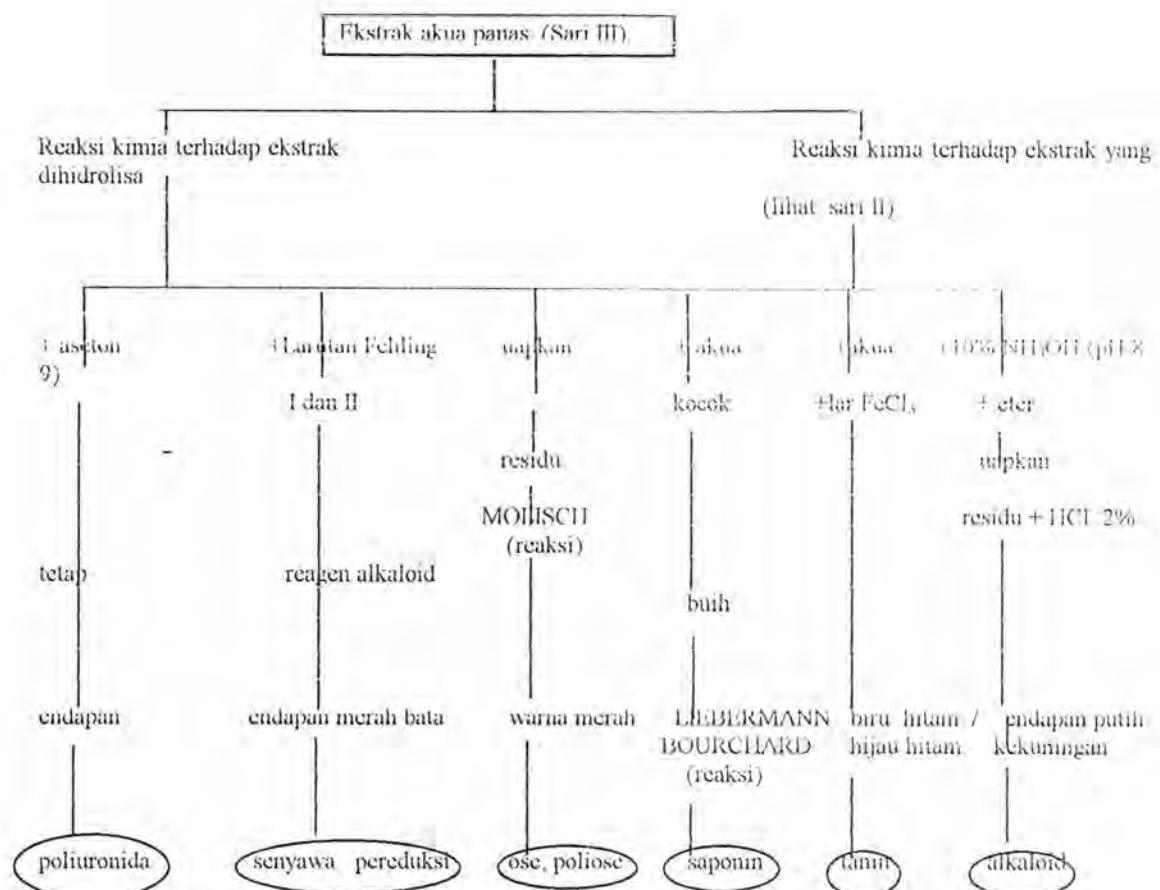
Bagan Proses identifikasi kandungan *E. triplinerve* adalah sebagai berikut:



Gambar : 4.4. Bagan pemeriksaan kandungan kimia ekstrak eter minyak tanah (Sari I)



Gambar : 4.5. Bagan Pemeriksaan kandungan kimia ekstrak metanol (Sari II)



Gambar : 4.6.: Bagan pemeriksaan kandungan kimia ekstrak akua panas (Sari III).

Keterangan :

Reaksi Liebermann-Burchard :

Dalam tabung reaksi, sari yang diteliti diuapkan sampai kering,, sisanya dilarutkan ke dalam asam asetat anhidrat dan kloroform. Melalui dinding tabung dialirkan asam sulfat pekat.

Jika diantara kedua cairan terbentuk cincin berwarna ungu atau merah coklat dan larutan bagian atas hijau atau ungu, menunjukkan adanya steroid atau triterpenoid.

Reaksi Shibata :

Sari yang diteliti diuapkan sampai kering, dilarutkan dengan metanol dan dipanaskan pada suhu 50° C., ditambah logam magnesium dan asam klorida pekat. Warna merah atau jingga menunjukkan adanya glikosida flavon.

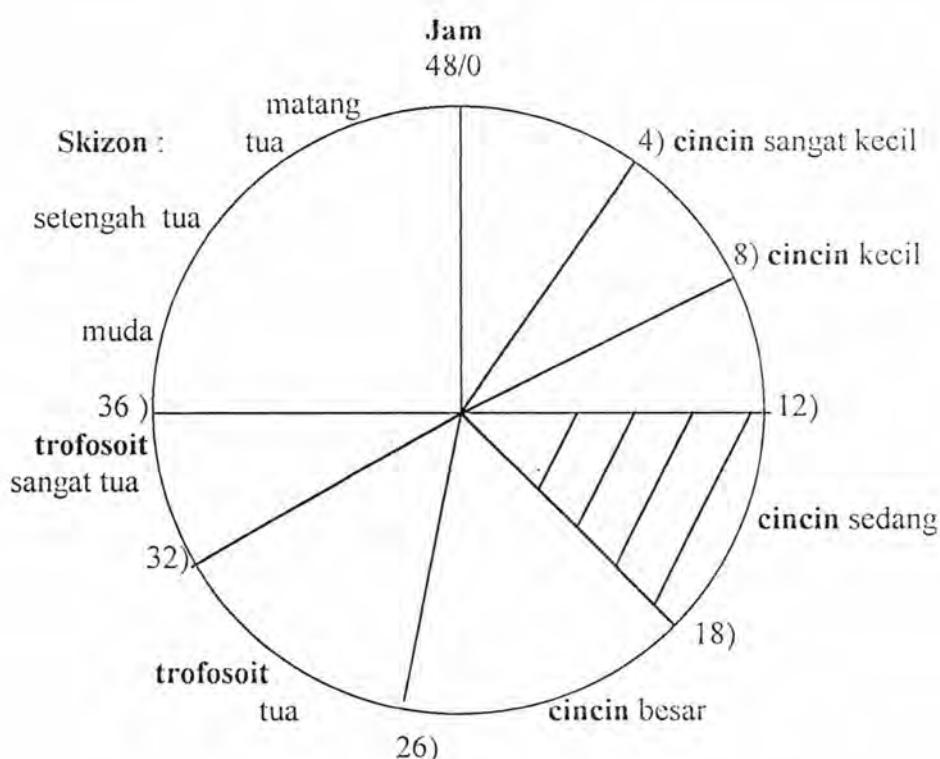
Reaksi Borntraeger:

Sari yang diteliti ditambah larutan amonia atau natrium hidroksida encer, dikocok. Jika terjadi warna merah menunjukkan adanya emodol.

Reaksi Carr-Price :

Sari yang diteliti diuapkan sampai kering, kemudian ditambah larutan jenuh antimon triklorida dalam kloroform. Jika terbentuk warna biru , kemudian menjadi merah yang jika ditambah asam sulfat pekat menjadi biru tua atau hijau kebiruan menunjukkan adanya karotenoid.

Lampiran : 7



Keterangan : Daerah bergaris menunjukkan daerah setelah plasmodium mengalami dua kali sinkronisasi (umur antara 12 sampai 18 jam).

(Sumber : WHO : SEA/Mal/119 (1977))

Gambar : 4.9. Bagan siklus hidup *P.falciparum* dalam eritrosit

Lampiran : 8

Hasil determinasi *Eupatorium triplinerve* Vahl.

Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOLOGI - LIPI
BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BOTANI
HERBARIUM BOGORIENSE

Jalan Raya Juanda No. 22-24, Bogor, Indonesia. Telepon (0251) 322035

No. 25/Skt/KJF/II/1992 .

Bogor, 20 Februari 1992

Kepada Yth.

Sdr. S. Brotosutaryo Apt
Jl. Borobudur no.7
Jakarta

Dengan Hormat,

Menunjuk surat Saudara tertanggal 13 Desember 1991.
No. 254/Skt/KJF/II/91 dengan ini diberitahukan bahwa
tumbuhan yang Saudara kirimkan ke Herbarium Bogoriense,
Balitbang Botani, Puslitbang Biologi - LIPI, Bogor, adalah
sebagai berikut :

<u>No.</u>	<u>Jenis</u>	<u>Suku</u>
1.	<u><i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl</u>	Asteraceae

Demikian, semoga berguna bagi saudara.





Lampiran : 9.

Perhitungan statistik dari kontrol negatif ,**Perhitungan uji t dari kontrol negatif I (K-1) dan kontrol negatif II (K-2) :**

(Budianto , 1989; Usman dkk 1995)

Jumlah skizon hidup minimal 3 inti setiap 200 plasmodium dalam kontrol (-1) dan kontrol (-2) adalah sebagai berikut : (Lihat Tabel : 5.2)

Macam uji	Pengulangan (n)	Jumlah skizon/ 200 plasmodium (X)
K(-1)	1	114
	2	118
	3	123
	Rata2 :	118,3 ± 4,5
K(-2)	1	119
	2	114
	3	125
	Rata2 :	119,3 ± 5,5

Keterangan :

K(-1) = kontrol negatif i tanpa pemberian 0,1% DMSO

K(-2) = kontrol negatif 2 dengan penambahan 0,1% DMSO.

Menentukan Ho dan Ha.:

Ho : tidak ada perbedaan secara bermakna pengaruh penambahan 0,1% DMSO terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.Ha : ada perbedaan secara bermakna pengaruh penambahan 0,1% DMSO terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

dimana :

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(3-1)(4,5)^2 + (3-1)(5,5)^2}{3 + 3 - 2}$$

$$s = 5,02 \text{ , Jadi : } t(\text{hitung}) = 0,486$$

t Tabel = 2,132 ($\alpha = 0,05$, df = 4 (n_1-1) + (n_2-1)) (Usman, dkk, 1995)

Jadi t hitung < t tabel maka Ho diterima.

Jadi : tidak ada perbedaan secara bermakna pengaruh penambahan 0,1% DMSO terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

Lampiran : 10

Perhitungan IC_{50} bermacam-macam ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* *in vitro*.

Tabel : 5.4.

Prosen penghambatan bermacam-macam ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* *in vitro*

Ekstrak	Pengulangan	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K(-2)
Eter minyak tanah	1	100	100	99	75	61	18	0
	2	100	100	84	62	53	16	0
	3	100	94	77	71	34	12	0
	Rata2	100	98	86,7	69,3	49,3	15,3	0
	SD (\pm)	0	3,46	11,2	6,66	13,9	3,05	
Kloroform	1	100	92	43	29	11	15	0
	2	100	94	56	22	15	7	0
	3	100	87	66	36	18	12	0
	Rata2	100	91	55	29	14,7	11,3	0
	SD (\pm)	0	3,6	11,5	7,0	3,51	4,0	
Metanol	1	100	87	54	32	8	7	0
	2	100	86	43	25	4	3	0
	3	100	87	43	36	3	4	0
	Rata2	100	86,7	46,7	31	5	4,7	0
	SD (\pm)	0	0,58	6,35	5,57	2,64	2,08	

Keterangan :

K = kadar bahan uji

K(-2) = kontrol negatif tanpa pemberian bahan uji

K1 = 10.000 μ g/mL K4 = 10 μ g/mL

K2 = 1.000 μ g/mL K5 = 1 μ g/mL

K3 = 100 μ g/mL K6 = 0,1 μ g/mL

Analisis data.

Dari data prosen penghambatan dapat dibuat kurva hubungan antara probit prosen penghambatan dengan log. kadar

Dari kurva tersebut dapat diperhitungkan IC_{50} , yaitu kadar

dimana prosen penghambatan pertumbuhan skizon sebesar 50%.

Lanjutan lampiran (10)

Tabel : 5.5.

Daftar log. kadar, prosen penghambatan dan probit dari bermacam-macam ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro

Ekstrak	Kadar μg/mL	log. kadar	Prosen penghamb- atan	Probit
Eter minyak tanah	10000	4	100	8,09
	1000	3	98	7,05
	100	2	86,7	6,08
	10	1	69,3	5,52
	1	0	49,3	4,97
	0,10	-1	15,3	3,96
Kloro- form	10000	4	100	8,09
	1000	3	91	6,25
	100	2	55	5,13
	10	1	29	4,45
	1	0	14,7	3,96
	0,10	-1	11,3	3,77
Metan- ol	10000	4	100	8,09
	1000	3	86,7	6,13
	100	2	46,7	4,92
	10	1	31	4,50
	1	0	5	3,36
	0,10	-1	4,7	3,25

Persamaan garis regresi $Y = a + bX$

X = Log kadar

Y = Probit

Pada IC_{50} maka probit $Y = 5,0$

Tabel : 5.6.

Persamaan garis regresi dan IC_{50} bermacam-macam ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro

Ekstrak	$Y = a + bX$	IC_{50} ($\mu\text{g/mL.}$)
Eter minyak tanah	$Y = 4,71797 + 0,73057 X$	2,245
Kloroform	$Y = 4,02571 + 0,83286 X$	14,7846
Metanol	$Y = 3,67229 + 0,97514 X$	27,2361

Lampiran 11.

Analisis varian (ANOVA) aktivitas berbagai ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro

Data % penghambatan dianalisis dengan menggunakan ANOVA model rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda. Data % penghambatan terlebih dulu ditransformasikan ke dalam bentuk log (Y+1) karena ada harga % penghambatan (Y) yang kurang dari 10%.

Tabel 5.7
Data transformasi penghambatan (Y) ke dalam bentuk Log (Y + 1) dari ekstrak daun *E. triplinerve*.

Ekstrak	Pengulangan	Y / Log(Y+1)	K(+2)	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Eter minyak tanah	1	Y	100	100	100	99	75	61	18
		Log(Y+1)	2,00	2,00	2,00	2,00	1,88	1,79	1,28
	2	Y	100	100	100	84	62	53	16
		Log(Y+1)	2,00	2,00	2,00	1,93	1,80	1,73	1,23
	3	Y	100	100	94	77	71	34	12
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,98	1,90	1,86	1,54	1,11
		Rata2	Log(Y+1)	2,00	2,00	1,99	1,94	1,85	1,69
		SD (±)		0	0	0,03	0,05	0,04	0,13
									0,09
Kloroform	1	Y	100	100	92	43	29	11	15
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,97	1,64	1,48	1,08	1,20
	2	Y	100	100	94	56	22	15	7
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,98	1,76	1,36	1,20	0,90
	3	Y	100	100	87	66	36	18	12
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,82	1,57	1,28	1,11
		Rata2	Log(Y+1)	2,00	2,00	1,96	1,74	1,17	1,18
		SD (±)		0	0	0,02	0,09	0,11	0,10
									0,15
Metanol	1	Y	100	100	87	54	32	8	7
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,74	1,52	0,95	0,90
	2	Y	100	100	86	43	25	4	3
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,64	1,41	0,70	0,60
	3	Y	100	100	84	43	36	3	4
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,93	1,64	1,57	0,60	0,70
		Rata2	Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,67	1,50	0,75
		SD (±)		0	0	0,01	0,06	0,08	0,18
									0,15

Keterangan :

Y = prosen penghambatan

K+ = klorokuin 4 pMol/50 uL = 0,03 µg/mL

K1 = 10.000 µg/mL

K4 = 10 µg/mL

K2 = 1.000 µg/mL

K5 = 1 µg/mL

K3 = 100 µg/mL

K6 = 100,1 µg/mL

Lanjutan lampiran : 11.

Tabel : 5.8
Rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda.

Ekstrak	Pengulangan	K(+)	K1	K2	K3	K4	K5	K6	Jumlah
Kontrol +	1	2,00							
	2	2,00							
	3	2,00							
	ΣY_{ij}	6,00							
	$(\Sigma Y_{ij})^2$	36							36,00
	ΣY_i								6,00
	$(\Sigma Y_i)^2$								36,00
Eter minyak tanah	1		2	2	2	1,88	1,79	1,28	
	2		2	2	1,93	1,8	1,73	1,23	
	3		2	1,98	1,9	1,86	1,54	1,11	
	ΣY_{ij}		6	5,98	5,83	5,54	5,06	3,62	
	$(\Sigma Y_{ij})^2$		36	35,76	33,99	30,69	25,60	13,10	
	ΣY_i								32,03
	$(\Sigma Y_i)^2$								1025,92
Kloroform	1		2	1,97	1,64	1,48	1,08	1,2	
	2		2	1,98	1,76	1,36	1,2	0,9	
	3		2	1,94	1,82	1,57	1,28	1,11	
	ΣY_{ij}		6	5,89	5,22	4,41	3,56	3,21	
	$(\Sigma Y_{ij})^2$		36	34,69	27,25	19,45	12,67	10,30	
	ΣY_i								28,29
	$(\Sigma Y_i)^2$								800,32
Metanol	1		2	1,94	1,74	1,52	0,95	0,9	
	2		2	1,94	1,64	1,41	0,7	0,6	
	3		2	1,93	1,64	1,57	0,6	0,7	
	ΣY_{ij}		6	5,81	5,02	4,50	2,25	2,20	
	$(\Sigma Y_{ij})^2$		36	33,76	25,20	20,25	5,06	4,84	
	ΣY_i								25,78
	$(\Sigma Y_i)^2$								664,61

Keterangan :

 $Y_{ij} = \log(Y+1) = \text{Log. prosen penghambatan}$ $K+ = \text{klorokuin } 4 \text{ pMol}/50 \mu\text{L} = 0,03 \mu\text{g/mL}$ $K_1 = 10,000 \mu\text{g/mL}$ $K_4 = 10 \mu\text{g/mL}$ $K_2 = 1,000 \mu\text{g/mL}$ $K_5 = 1 \mu\text{g/mL}$ $K_3 = 100 \mu\text{g/mL}$ $K_6 = 0,1 \mu\text{g/mL}$

Lanjutan lampiran : 11

Menentukan H_0 dan H_a :

H_0 = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

H_0 = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dalam setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

H_a = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

H_a = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dalam setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

Perhitungan ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda.

$$N = \text{Jumlah percobaan} = 3 \times 1 + 3 \times 6 + 3 \times 6 + 3 \times 6 = 57$$

$$s = \text{replikasi} = \text{pengulangan} = 3$$

$$r = \text{kelompok kadar dalam tiap perlakuan}$$

$$(r_1 = 1; r_2 = 6; r_3 = 6; r_4 = 6)$$

$$C = \sum Y_i^2 : N = (6 + 32 + 28,3 + 25,8)^2 : 57 = 148,814$$

$$\begin{aligned} \text{SS kelompok (kadar)} &= (\sum Y_{ij}^2 : s) - C = (6^2 + 6^2 + 5,98^2 + \dots + 2,2^2) : 3 - C \\ &= 158,875 - 148,814 = 10,0605 \end{aligned}$$

$$df = L - 1 = (1 + 6 + 6 + 6) - 1 = 18$$

$$\begin{aligned} \text{SS perlakuan (SSA)} &= (\sum Y_i^2 : s.r) - C = (6^2 : 3 + 32,03^2 : 18 + 28,29^2 : 18 + \\ &\quad 25,78^2 : 18) - C = 151,150 - 148,814 = 2,336 \end{aligned}$$

$$df = i - 1 = 4 - 1 = 3 \quad (i = \text{jenis fraksi})$$

$$\begin{aligned} \text{SS Total (SS)} &= \sum Y_{ijk}^2 - C = (2^2 + 2^2 + \dots + 0,7^2) - C = 159,1737 - 148,8142 = \\ &= 10,3595 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{SS antar sumur dalam kelompok kadar (sampling error)} &= \text{SS total} - \text{SS kadar} = \\ &= (\text{SS residual} = \text{SSE}) = 10,3595 - 10,0605 = 0,2990 \end{aligned}$$

$$df = (N-1)-(L-1) = (N-L) = 57-19=38$$

$$\text{SS antar kelompok kadar dalam perlakuan (experimental error)} =$$

$$\text{SS kadar} - \text{SS perlakuan} = \text{SSB} = 10,0605 - 2,3360 = 7,7245$$

$$df = (L-1)-(i-1) = (L-i) = 19 - 4 = 15$$

Lanjutan lampiran : 11.

Tabel : 5.9.

Tabel ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah subsampling yang berbeda

Sumber variansi	df	SS	MS
Antar kelompok (kadar)	$(L - 1) = 19 - 1 = 18$	$SS = 10,3595$	
Antar perlakuan (jenis fraksi)	$(i - 1) = 4 - 1 = 3$	$SSA = 2,3358$	$MSA = SSA : (i - 1) = 2,3358 : 3 = 0,78$
Antar kelompok dalam perlakuan (Exp. error)	$(L - i) \times (i - 1) = (19 - 4) \times 3 = 15$	$SS \text{ kelomp} = SSB = 10,0605$	$MSB = SSB : (i - 1) = 10,06 : 15 = 0,67$
Antar sumur dalam kelompok (Sampling error)	$(N - 1) \times (L - 1) = (N - L) = 57 - 19 = 38$	$SSE = 0,2995$	$MSE = SSE : (N - 1) = 0,2995 : 38 = 0,007$
Total	$(N - 1) = 57 - 1 = 56$		

Dari tabel di atas dapat diperoleh harga F hitung :

$$F \text{ hitung } 1 = MSA : MSE = MS \text{ perlakuan} : MS \text{ experimental error} \\ = 0,78 : 0,007 = 111,43 \quad \text{-----> (df 3 dan 15)}$$

$$F \text{ hitung } 2 = MSB : MSE = MS \text{ experimental error} : MS \text{ sampling error} = \\ = 0,67 : 0,007 = 95,71 \quad \text{-----> (df 15 dan 38)}$$

Perbandingan harga F hitung dengan F tabel:

$$F \text{ tabel } 1 = \alpha, (i-1), (L-1).$$

$$\alpha = 0,05 ; df = 3 \text{ dan } 15$$

$$F \text{ tabel } 1 = 2,353 \text{ dan } 1,753$$

$$F \text{ hitung } 1 > F \text{ tabel } 1$$

$$F \text{ tabel } 2 = \alpha, (i-1), (N-1).$$

$$\alpha = 0,05 ; df = 15 \text{ dan } 38$$

$$F \text{ tabel } 2 = 1,753 \text{ dan } 1,686$$

$$F \text{ hitung } 2 > F \text{ tabel } 2$$

Kesimpulan.

$F \text{ hitung } 1 > F \text{ tabel } 1$, maka H_0 ditolak dan H_a diterima

Berarti : Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

$F \text{ hitung } 2 > F \text{ tabel } 2$, maka H_0 ditolak dan H_a diterima

Berarti : Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dalam setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

Lampiran : 12

Perhitungan IC_{50} bermacam-macam isolat dari ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

Tabel : 5.12

Daftar log. kadar, prosen penghambatan dan probit dari bermacam-macam isolat ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

Isolat	Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Log. kadar (X)	Prosen peng- hambatan	Probit (Y)
I	200	2,301	55	5,13
	100	2	22	4,23
	50	1,699	13	3,87
	25	1,398	11	3,77
	12,5	1,097	5,6	3,45
	6,25	0,796	0	0
II	100	2	99,3	7,46
	50	1,699	99,3	7,46
	25	1,398	77,3	5,74
	12,5	1,097	58	5,20
	6,25	0,796	40,6	4,75
	3,125	0,495	33	4,56
III	200	2,301	100	8,09
	100	2	100	8,09
	50	1,699	84,7	6,04
	25	1,398	64,7	5,39
	12,5	1,097	31,3	4,50
	6,25	0,796	6	3,36

Persamaan garis regresi $Y = a + bX$

X = Log kadar

Y = Probit

Pada IC_{50} maka probit $Y = 5,0$.

Tabel : 5.13

Persamaan garis regresi dan IC_{50} bermacam-macam isolat ekstrak daun *E.triplinerve* terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

Isolat	$Y = a + bX$	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
I	$Y = -0,7215 + 2,6664 X$	139,78
II	$Y = 3,118 + 2,19934 X$	7,17323
III	$Y = 0,75686 + 3,3289 X$	18,82071

Lampiran : 13

Analisis varian (ANOVA).

Tabel : 5.14.

Rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda dari isolat ekstrak daun E. triplinerve.

Isolat	Pengulangan	K(+)	K2	K3	K4	K5	K6	K7	Jumlah
Kontrol (+)	1	2,00							
	2	2,00							
	3	2,00							
	ΣY_{ij}	6,00							
	Y_{ij}	2,00							
	ΣY_i								6,00
Isolat I	$(\Sigma Y_i)^2$								36,00
	$(\Sigma Y_{ij})^2$								36,00
	1		1,75	1,28	1,15	1,11	0,70		-
	2		1,79	1,51	1,28	1,26	0,95		
	3		1,71	1,28	0,95	0,70	0,78		
	ΣY_{ij}		5,25	4,07	3,38	3,07	2,43		
Isolat II	Y_{ij}		1,75	1,36	1,13	1,02	0,81		
	ΣY_i								18,200
	$(\Sigma Y_i)^2$								331,24
	$(\Sigma Y_{ij})^2$								70,86
	1			2,00	1,90	1,77	1,65	1,45	
	2			2,00	1,89	1,70	1,68	1,49	
Isolat III	3			2,00	1,90	1,83	1,51	1,63	
	ΣY_{ij}			6,00	5,69	5,30	4,84	4,57	
	Y_{ij}			2,00	1,90	1,77	1,61	1,52	
	ΣY_i								26,40
	$(\Sigma Y_i)^2$								696,96
	$(\Sigma Y_{ij})^2$								140,77
Isolat III	1		2,00	1,94	1,85	1,54	0,78		
	2		2,00	1,95	1,82	1,57	1,08		
	3		2,00	1,90	1,79	1,40	0,48		
	ΣY_{ij}		6,00	5,79	5,46	4,51	2,34		
	Y_{ij}		2,00	1,93	1,82	1,50	0,78		
	ΣY_i								24,100
Isolat III	$(\Sigma Y_i)^2$								580,81
	$(\Sigma Y_{ij})^2$								125,15
	36,00		33,52	29,81	20,34	5,48			

Keterangan :

 $K+ = \text{klorokuin } 4 \text{ pMol}/50 \text{ uL} = 0,03 \text{ } \mu\text{g/mL}$ $K2 = 100 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad K5 = 12,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ $K3 = 50 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad K6 = 6,25 \text{ } \mu\text{g/mL}$ $K4 = 25 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad K7 = 3,125 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Lanjutan lampiran : 13

Menentukan H_0 dan H_a

H_0 = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*.

H_0 = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dari setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*

H_a = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*

H_a = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dari setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*

Perhitungan ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda
 N = jumlah percobaan = $3 \times 1 + 3 \times 5 + 3 \times 5 + 3 \times 5 = 48$

S = replikasi = pengulangan = 3

R = kelompok kadar dalam tiap perlakuan ; ($r_1 = 1$; $r_2 = 5$; $r_3 = 5$; $r_4 = 5$)

L = variasi kadar = $1 + 5 + 5 + 5 = 16$

$$C = (\sum Y_i)^2 : N = (6 + 26,40 + 24,10 + 18,20)^2 : 48 = 116,252$$

$$SS \text{ kadar} = (\sum Y_{ij}^2 : s) - C =$$

$$(36 + 140,77 + 125,15 + 70,86) : 3 - C = 124,26 - 116,252 = 8,008$$

$$df = (L-1) = 15$$

$$SS \text{ perlakuan (treatmen)} (SSA) = (\sum Y_{i2} : sr) - C =$$

$$= (6^2 : 3 + 26,40^2 : 15 + 24,10^2 : 15 + 18,20^2 : 15) - 116,252 = 3,011$$

$$df = (i-1) = 2$$

$$SS \text{ total (SS)} = \sum Y_{ij}^2 - C = (2^2 + 2^2 + \dots + 0,48^2) - 116,252 = 9,078$$

$$SS \text{ antar sumur dalam kelompok kadar (sampling error)} = SS \text{ total} - SS \text{ kadar} = \\ = 9,078 - 8,008 = 1,070$$

$$df = (N-1)-(L-1) = 48 - 16 = 32$$

$$SS \text{ antar kelompok kadar dalam perlakuan (experimental error)} = SSB = \\ = SS \text{ kadar} - SS \text{ perlakuan} = 8,008 - 3,011 = 4,997$$

Tabel : 5.15

Tabel ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah subsampling yang berbeda.

Sumber variasi	df	SS	MS
Antar kelompok (kadar)	$(L - 1) = 16 - 1 = 15$	$SS = 3,900$	
Antar perlakuan (jenis fraksi)	$(i - 1) = 3 - 1 = 2$	$SSA = 3,011$	$MSA = SSA : (i - 1) = 3,011 : 2 = 1,5005$
Antar kelompok dalam perlakuan (Exp. error)	$(L - 1) - (i - 1) = (L - i) = 16 - 3 = 13$	$SS \text{ kclomp} = SSB = 4,997$	$MSB = SSB : (L - i) = 4,997 : 13 = 0,3844$
Antar sumur dalam kelompok (Sampling error)	$(N - 1) - (L - 1) = (N - L) = 48 - 16 = 32$	$SSE = 1,070$	$MSE = SSE : (N - L) = 1,070 : 32 = 0,0334$

Lanjutan lampiran 13.

Dari tabel di atas diperoleh F hitung :

$$F \text{ hitung } 1 = MSA : MSE = 1,5005 : 0,0334 = 44,93 \quad (df = 2, 13)$$

$$F \text{ hitung } 2 = MSB : MSE = 0,3844 : 0,0334 = 11,509 \quad (df: 13; 33)$$

$$F \text{ tabel } 1 = 2,920; 1,771$$

$$F \text{ tabel } 2 = 1,771; 1,690$$

Jadi :

$F \text{ hitung } 1 > F \text{ tabel } 1$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima

$F \text{ hitung } 2 > F \text{ tabel } 2$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima.

Berarti :

1. Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*.
2. Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dari setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro*

Perhitungan LSD (Least Significant Difference)= Beda Nyata Jujur (BNJ).

$$LSD = t((\alpha / 2, N-L) \sqrt{2 \cdot MSE} / s$$

$$= t(0,025; 33) \sqrt{2 \times 0,0334} / 3 = 2,042 \times 0,14922 = 0,3047$$

Tabel : 5.16

Tabel selisih harga rata-rata tiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* dengan harga rata-rata kontrol positif (Y11)

	Y11	YII 2	Y11	YIII 2	Y11
YI 2	0,25		0		0
YI 3	0,64	YII 3	0	YIII 3	0,07
YI 4	0,87	YII 4	0,10	YIII 4	0,18
YI 5	0,98	YII 5	0,23	YIII 5	0,50
YI 6	1,19	YII 6	0,39	YIII 6	1,22
YI 7	-	YII 7	0,48	YIII 7	-

Keterangan :

Y11 = harga rata-rata kontrol positif

YI 2-I 6 = harga rata-rata isolat I dengan K1-K6

YII 2-II 7 = harga rata-rata isolat II dengan K1-K7

YIII 2-III 6 = harga rata-rata isolat III dengan K1-K6

Hasil :

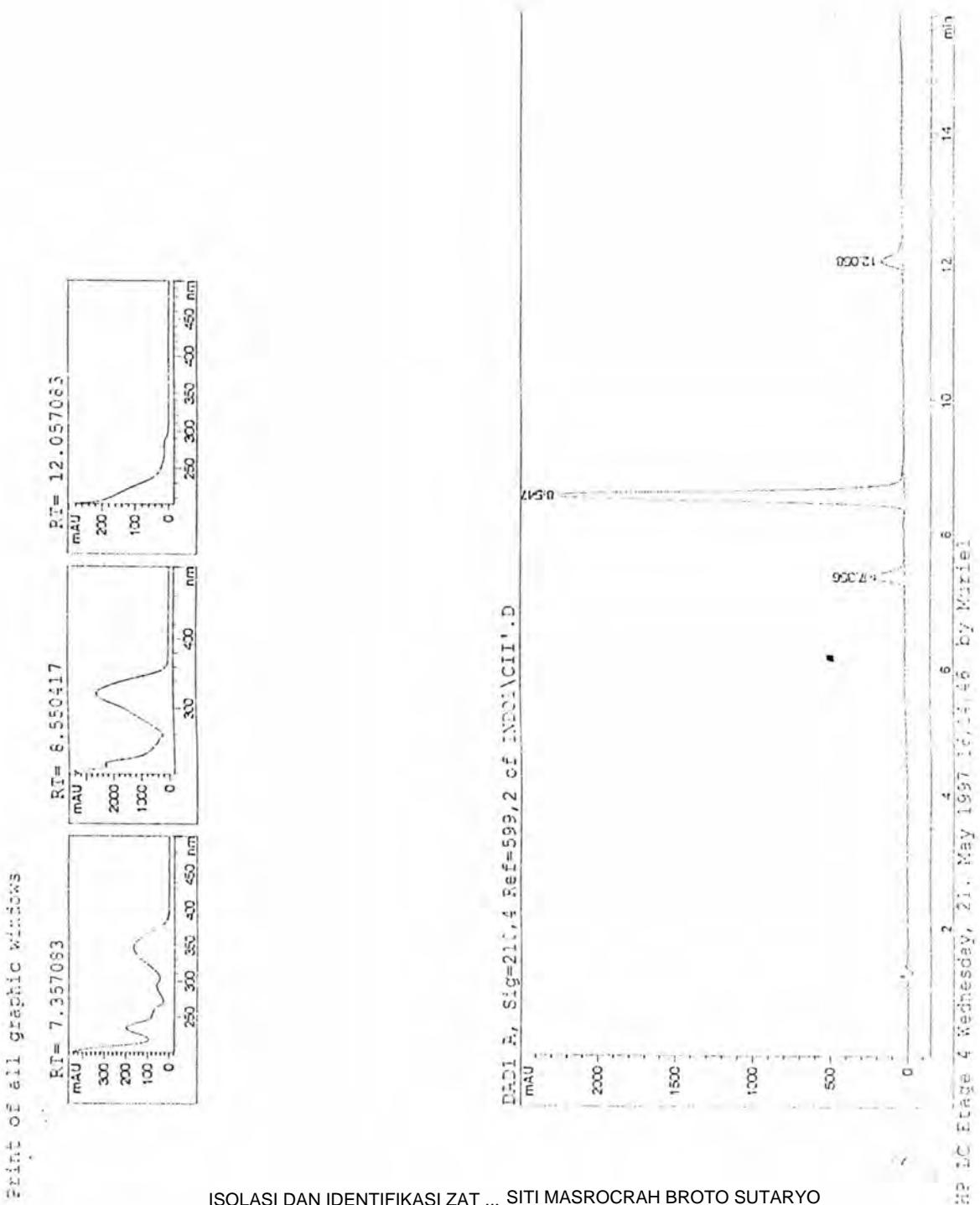
Yang mempunyai efek relatif sama dengan kontrol positif yaitu yang mempunyai selisih harga yang lebih kecil daripada harga LSD (mempunyai daya hambat seperti kontrol positif) adalah :

Isolat I dengan kadar $\geq 100 \mu\text{g/mL}$

Isolat II dengan kadar $\geq 12,5 \mu\text{g/mL}$

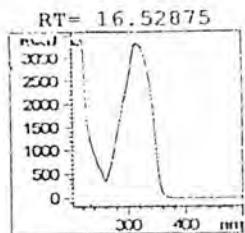
Isolat III dengan kadar $\geq 25 \mu\text{g/mL}$

Lampiran : 14 a.

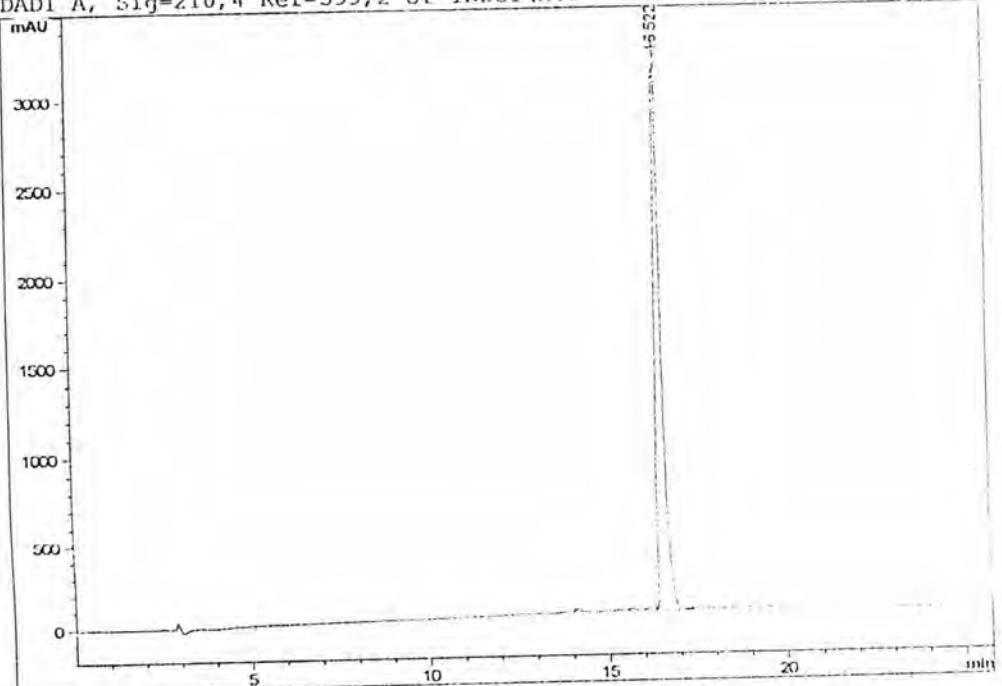
Hasil pengukuran KCKT isolat II

Lampiran : 14 b.

Hasil Pengukuran isolat II setelah pemurnian dengan MPLC



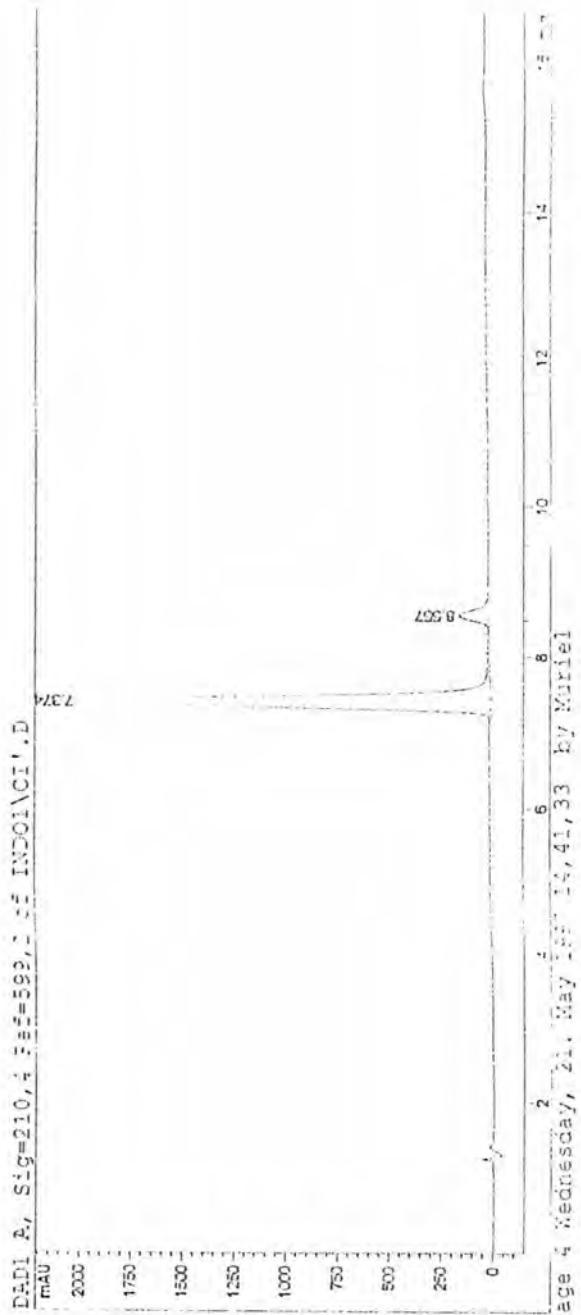
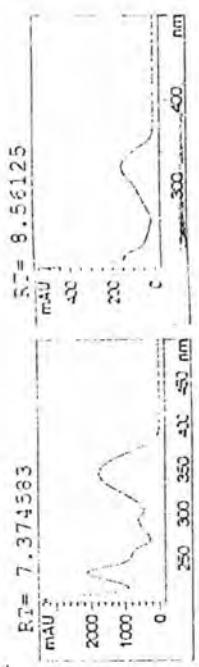
DAD1 A, Sig=210,4 Ref=599,2 of INDO1\X.D



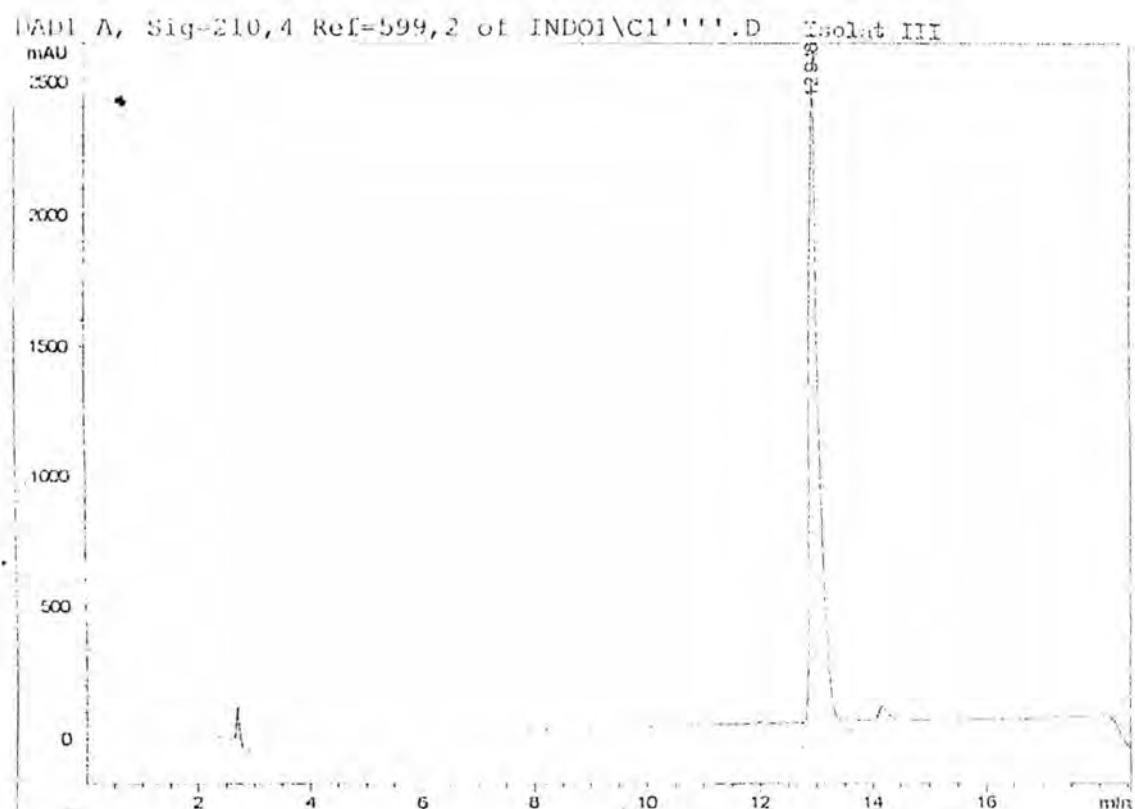
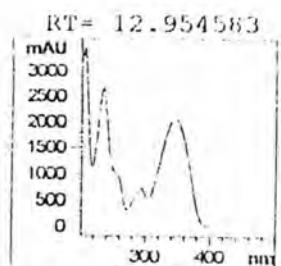
HP LC Etage 4 Friday, 13. June 1997 10,59,06 by Muriel

Lampiran : 14 c.

Hasil Pengukuran KCKT Isolat III



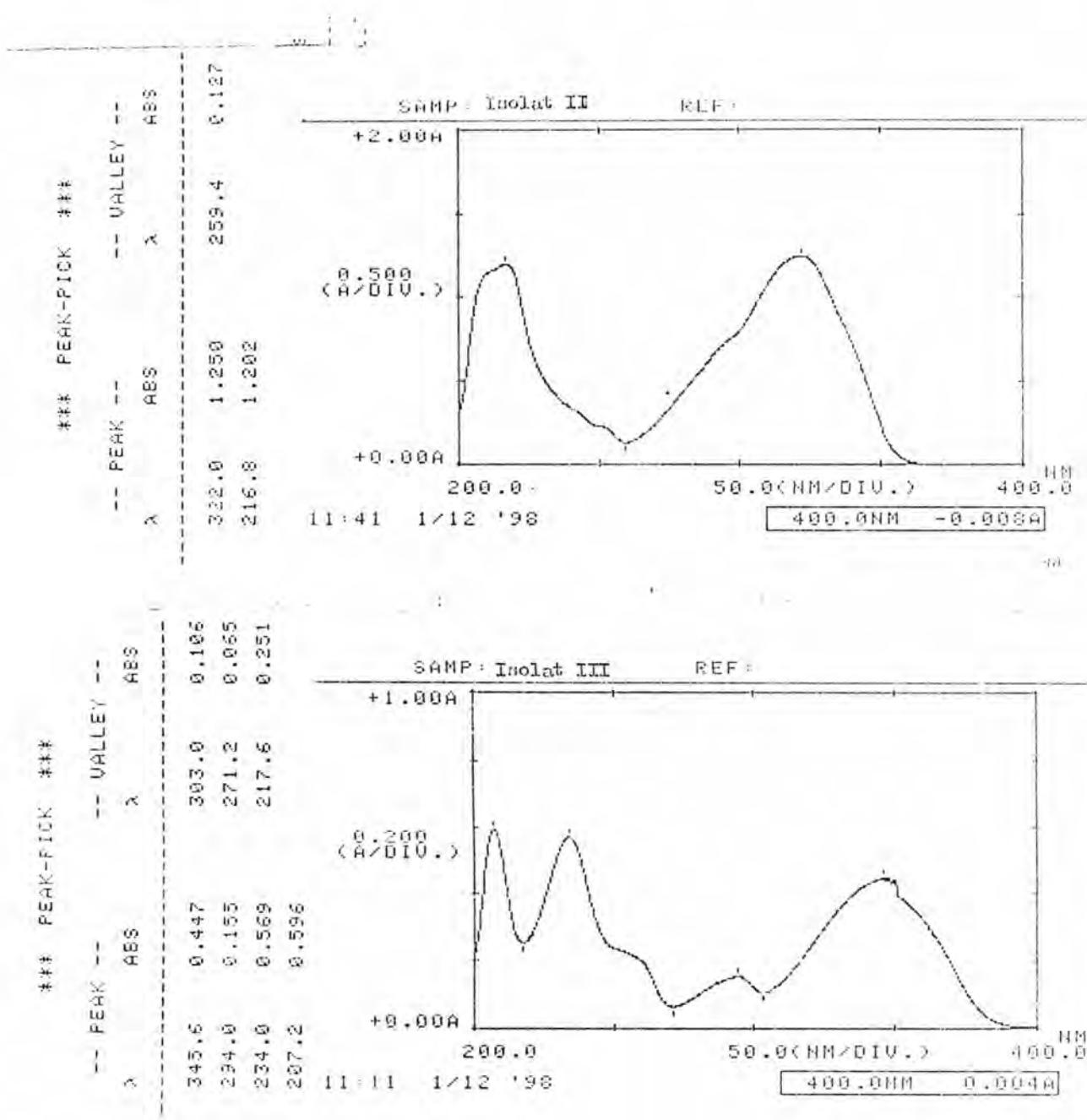
Hasil pengukuran KCKT isolat III setelah pemurnian dengan MPLC



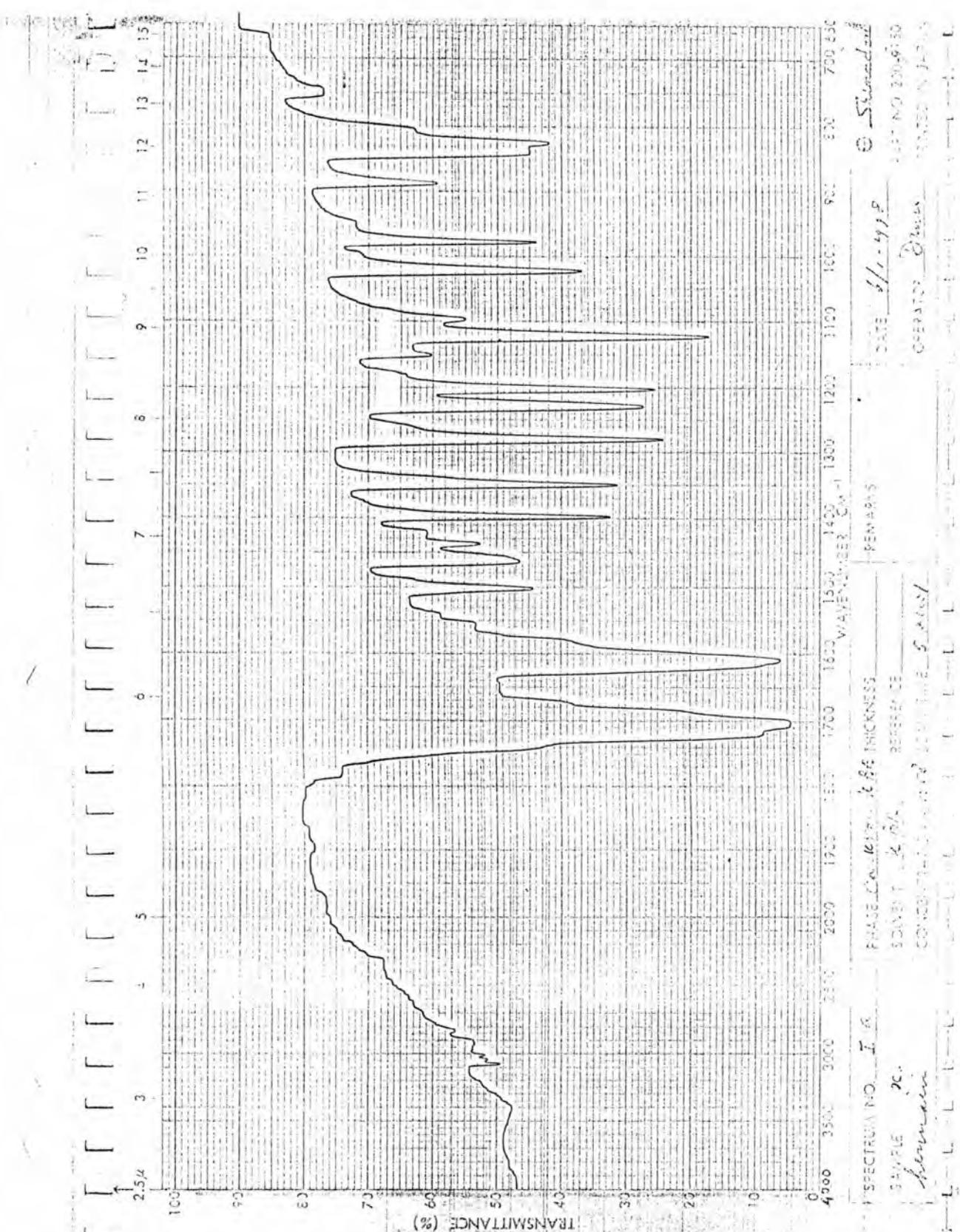
HP LC Etage 4 Tuesday, 24. June 1997 10,42,42 by Muriel

Lampiran : 15

Spektrum ultraviolet isolat II dan isolat III

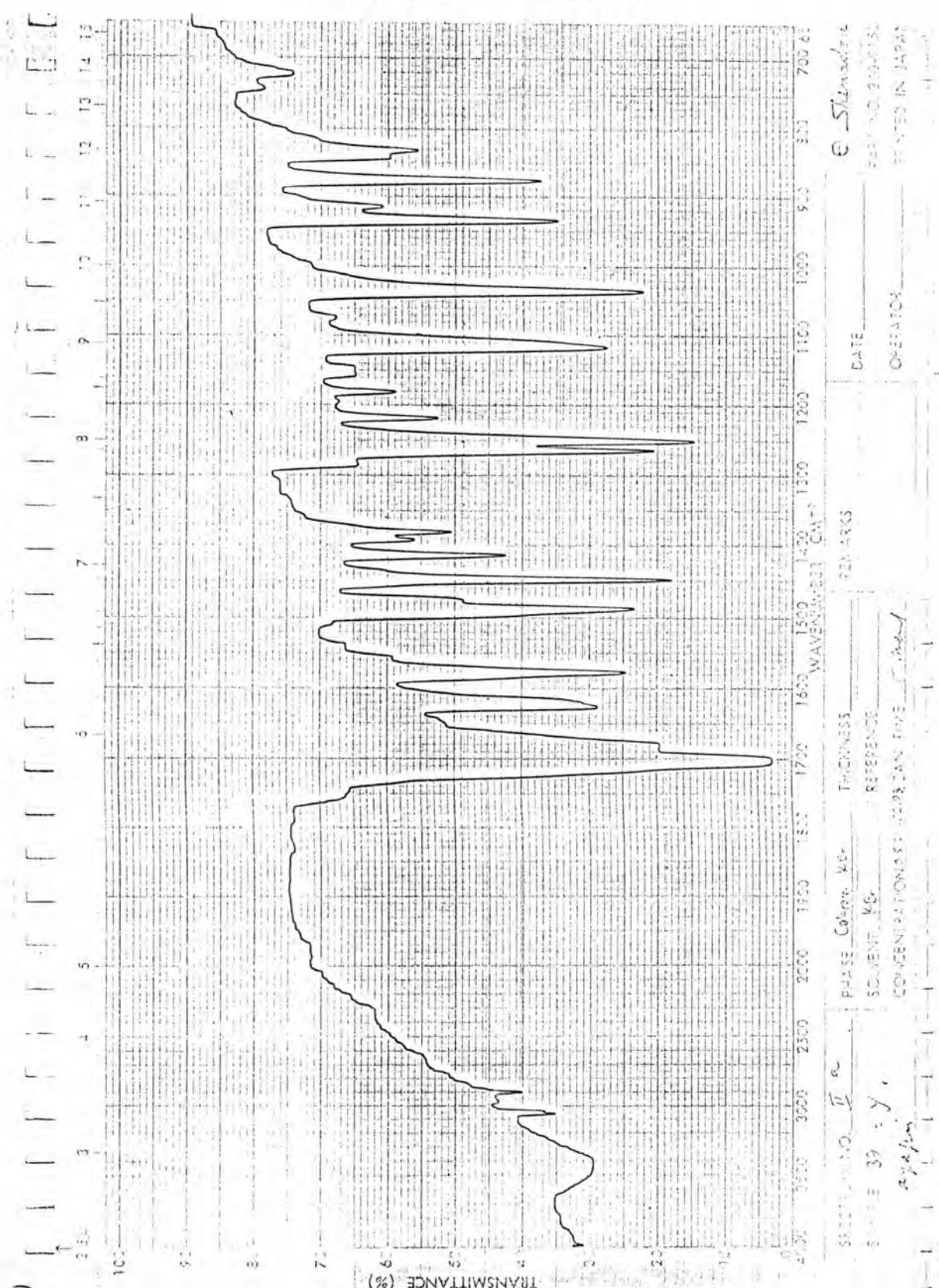


Spektrum infra merah isolat II.



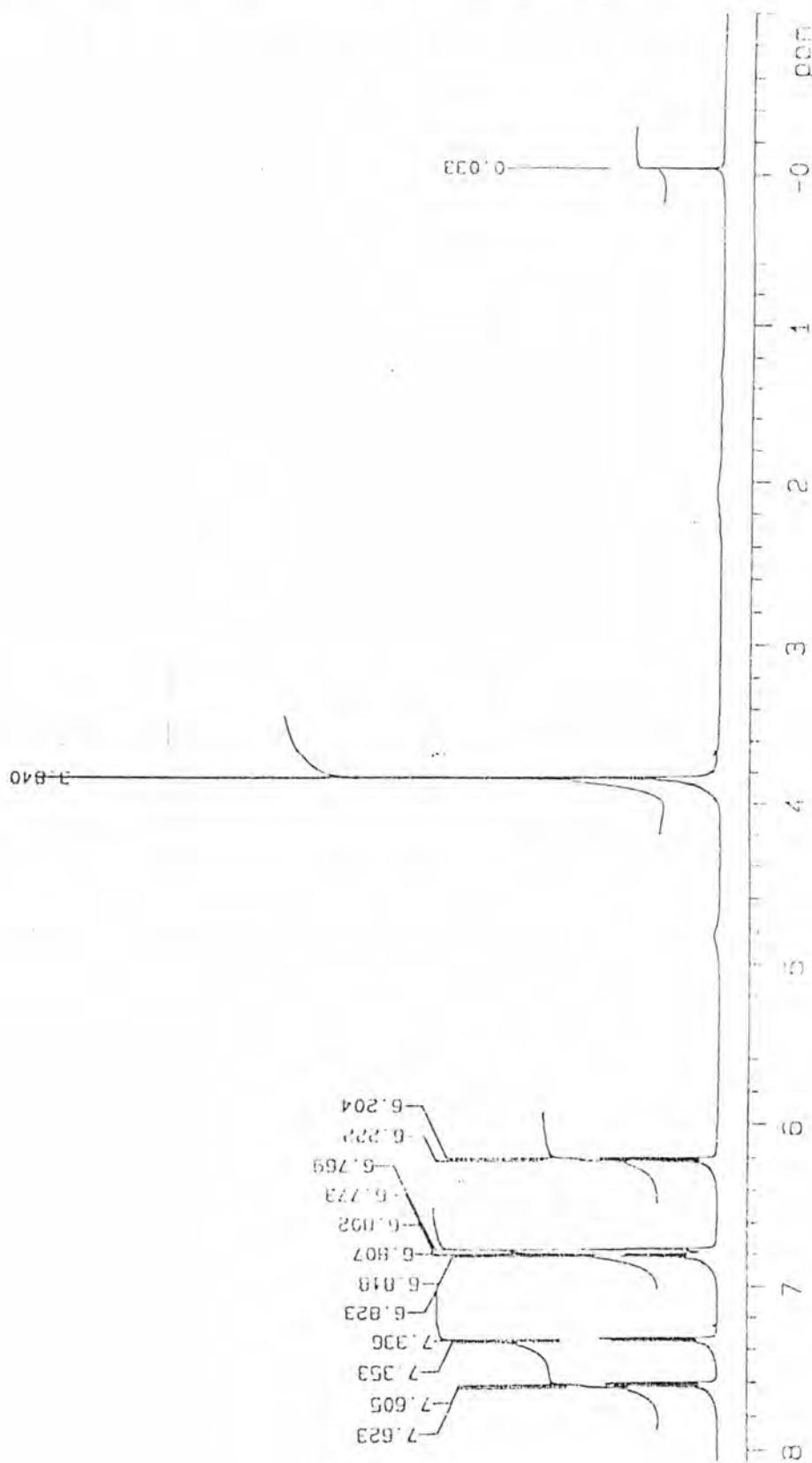
Lampiran : 17

Spektrum infra merah isolat III .



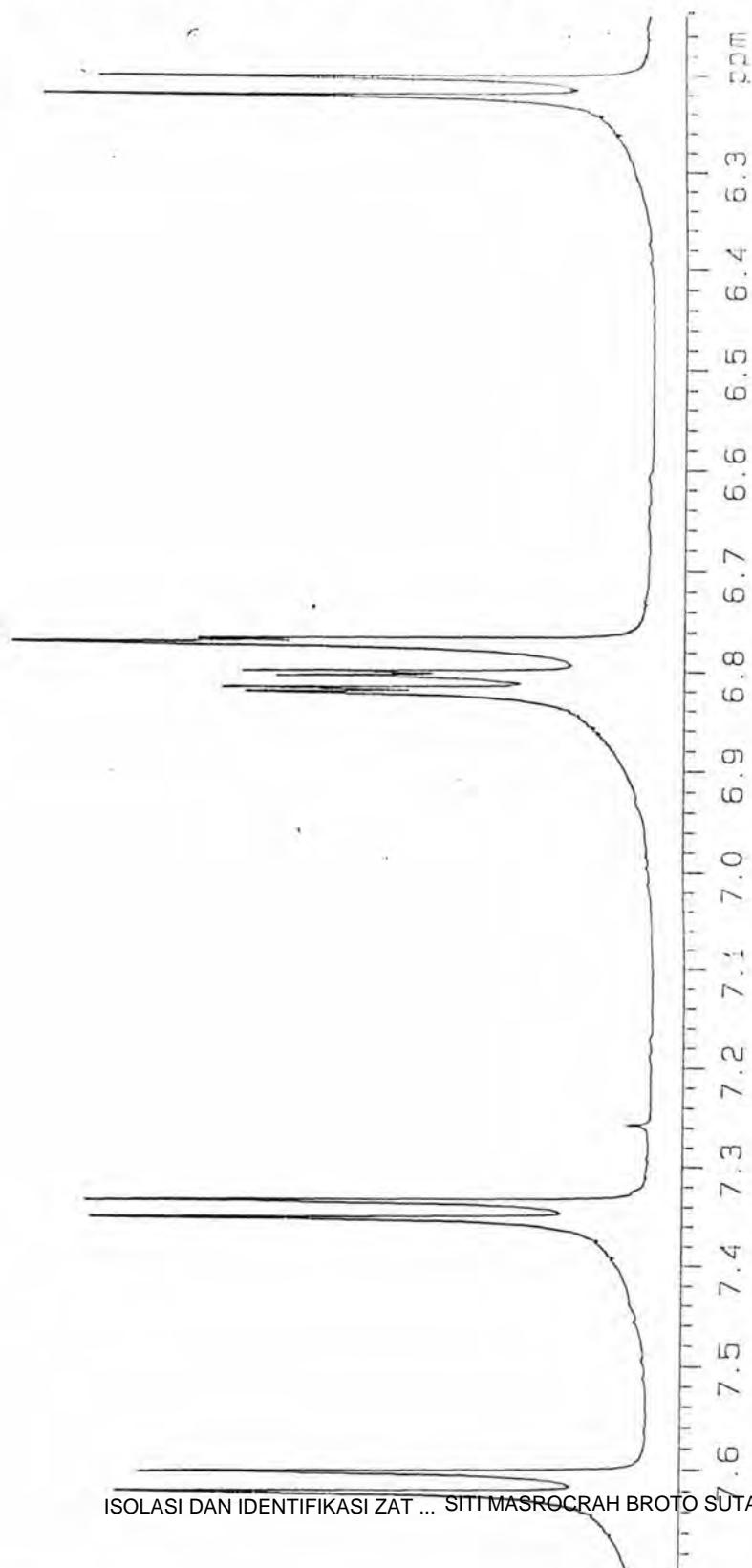
Lampiran : 18 a

Spektrum ^1H -RMI (500 Mhz.) dalam CDCl_3 26.0 C/299.1 K dari isolat II

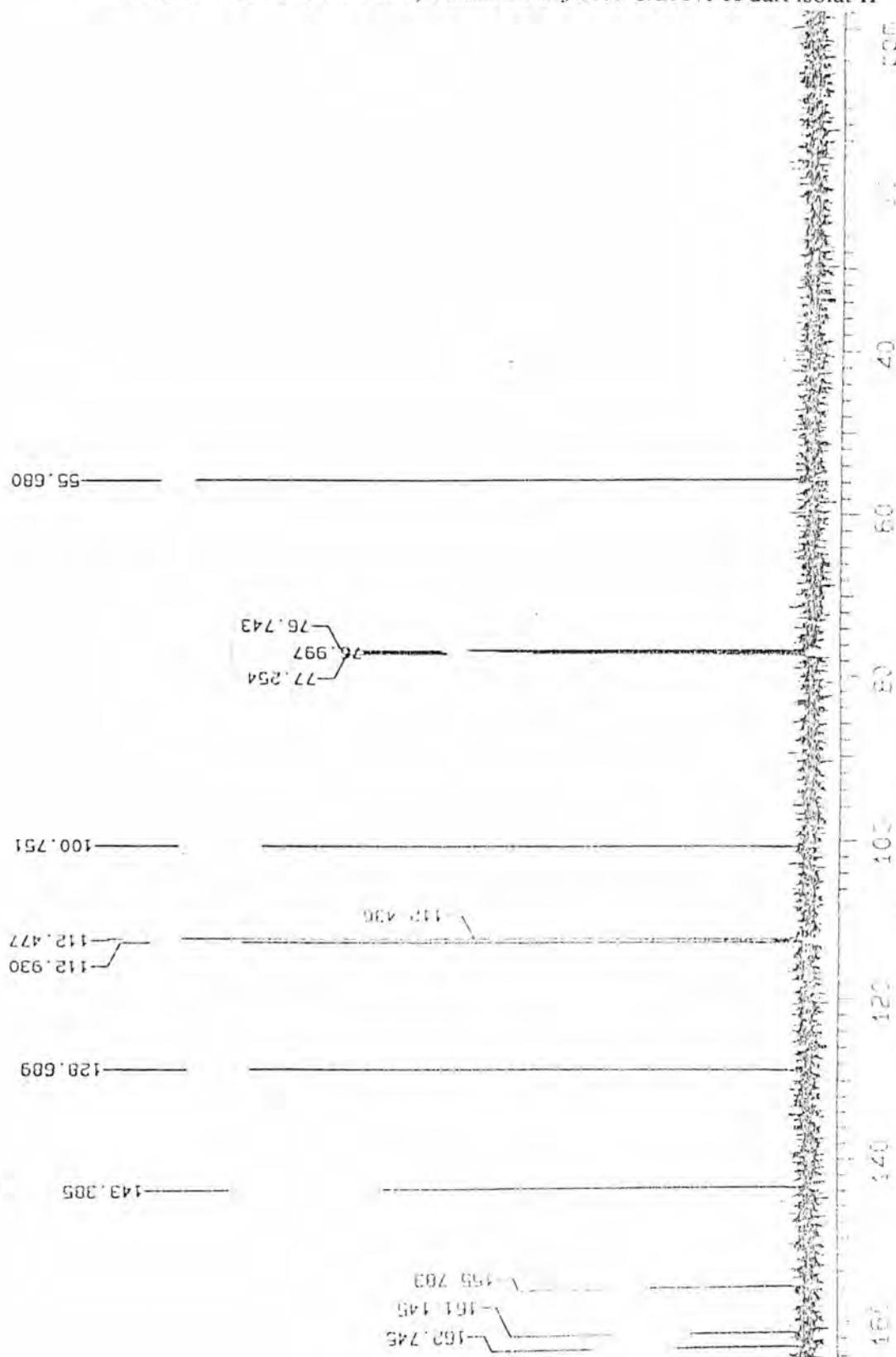


Lampiran : 18 b

Spektrum ^1H -RMI (500 Mhz.) dalam CDCl_3 26.0 C/299.1 K dari isolat II

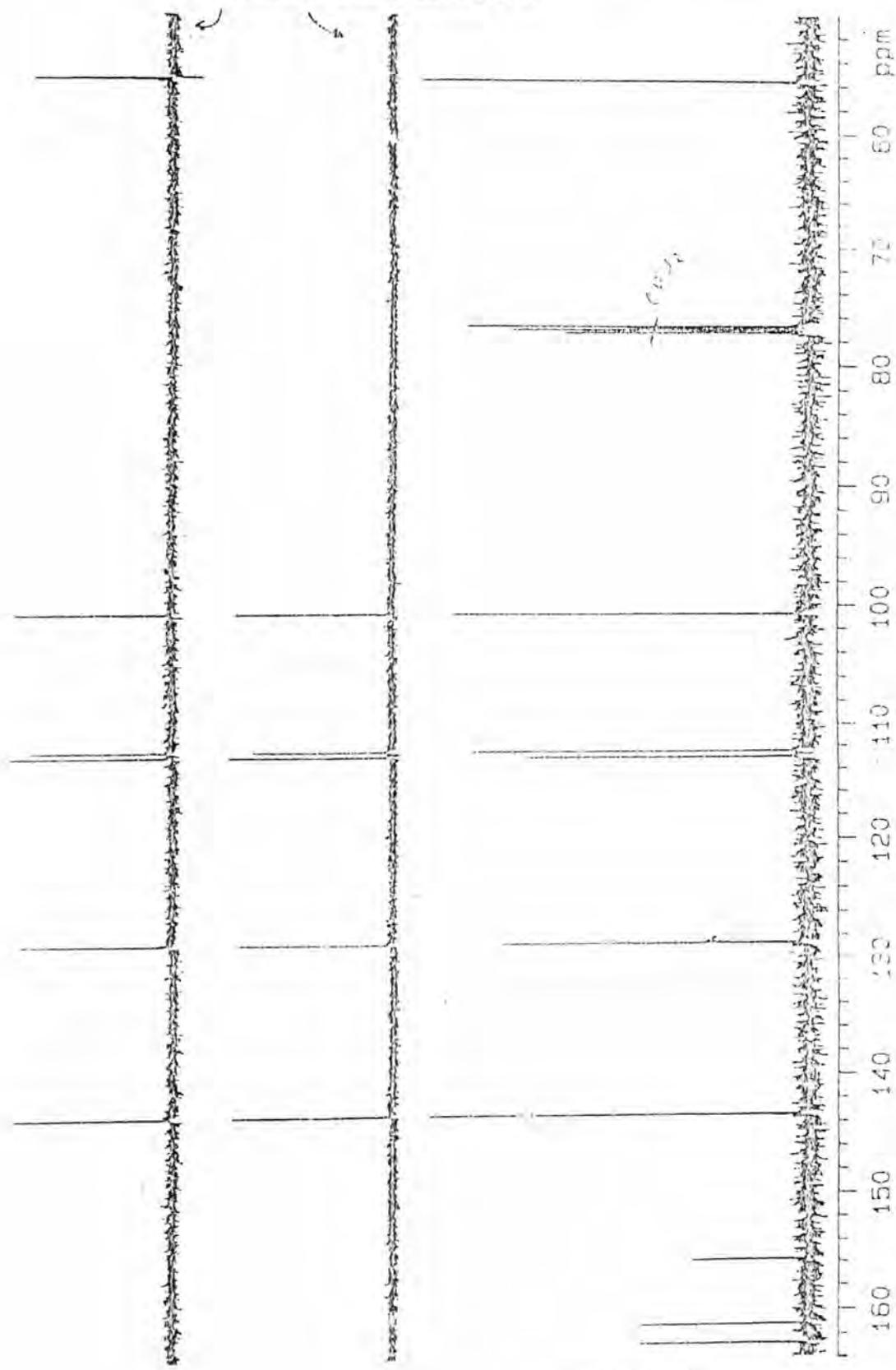


Lampiran : 18 c

Spektrum ^{13}C -RMI (125 Mhz.) dalam CDCl_3 26.0 C/299.1 K dari isolat II

Lampiran : 18 d

Spektrum DEPT dari isolat II



Lampiran : 18 e

Spektrum ^1H - ^1H cosy dari isolat II

STANDARD PROTON PARAMETERS

Solvent: CDCl₃

Temp. 25.0 C / 299.1 K

User: 1-14-B7

File: indant_gedcosy

UNITYplus-500 "ictsun3"

SEQUENCE: gmqfcdcs_ca

Relax. delay 1.500 SEC

Acq. time 0.126 sec

Width 8000.0 Hz

2D Width 8000.0 Hz

Single scan

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 499.8472 Hz

DATA PROCESSING

SG. sine bell 0.128 sec

Shifted by -0.128 sec

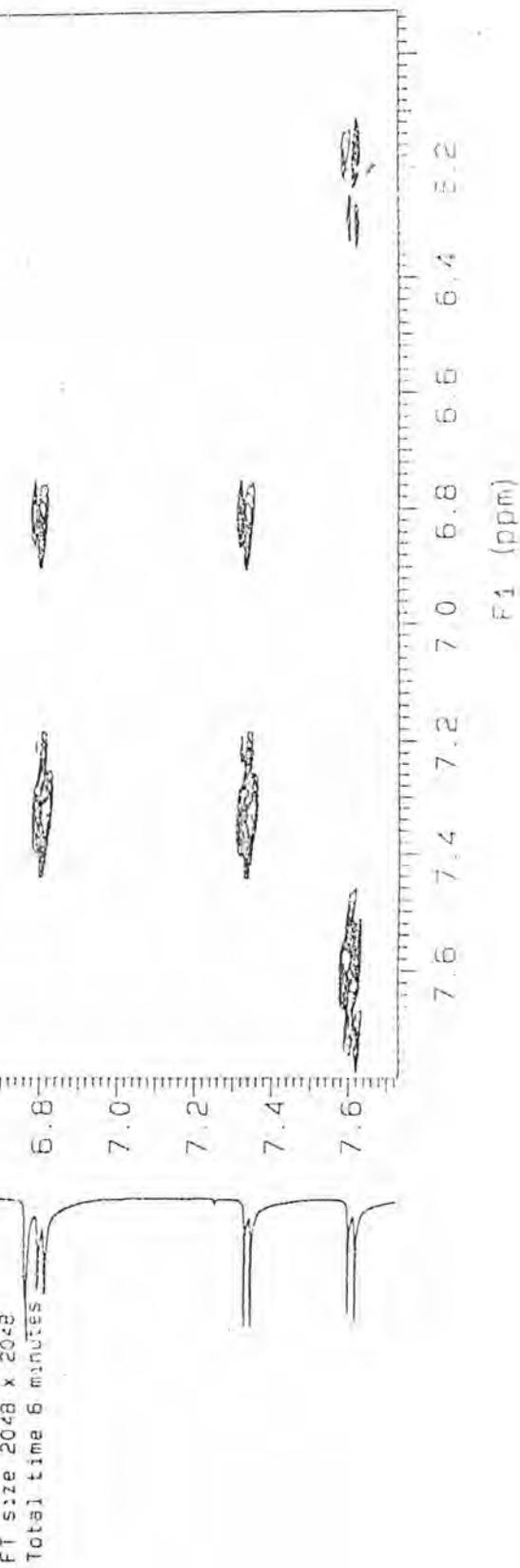
1. DATA PROCESSING

SG. sine bell 0.016 sec

Shifted by -0.016 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 6 minutes



STANDARD PROTON PARAMETERS

Solvent: CDCl₃
Temp. 26.0 C / 299.1 K

User: 1-14-87

File: indon1_GHSQC

UNITYplus-500 "ictsun3"

PULSE SEQUENCE: ghsqc_da

Relax. delay 1.162 sec

Acq. time 0.200 sec

Width 8000.0 Hz

2D Width 12940.8 Hz

2 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 499.8645162 MHz

DECOPPLE C13, 125.7033784 MHz

Power 41 dB

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.200 sec

Shifted by -0.200 sec

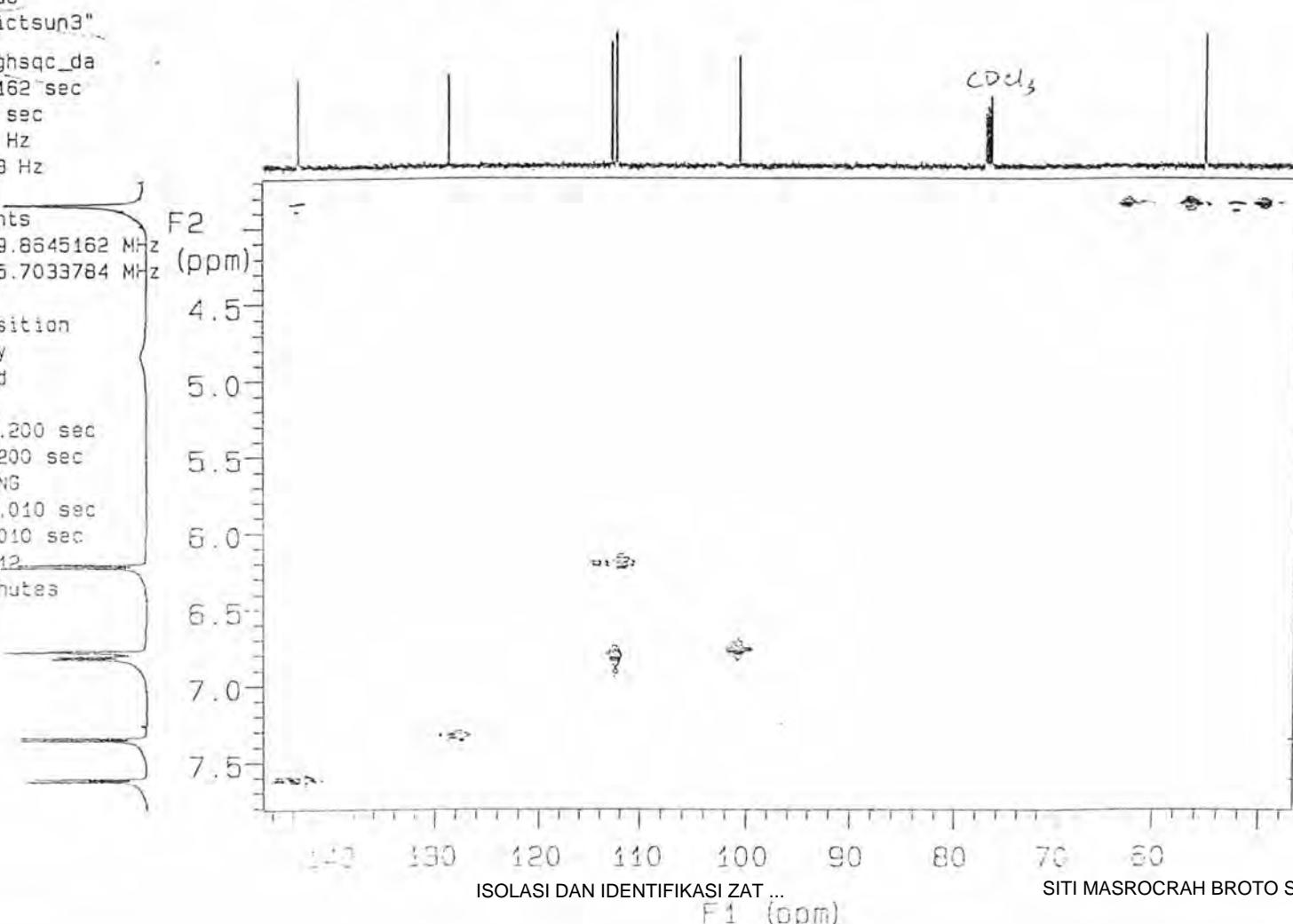
F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.010 sec

Shifted by -0.010 sec

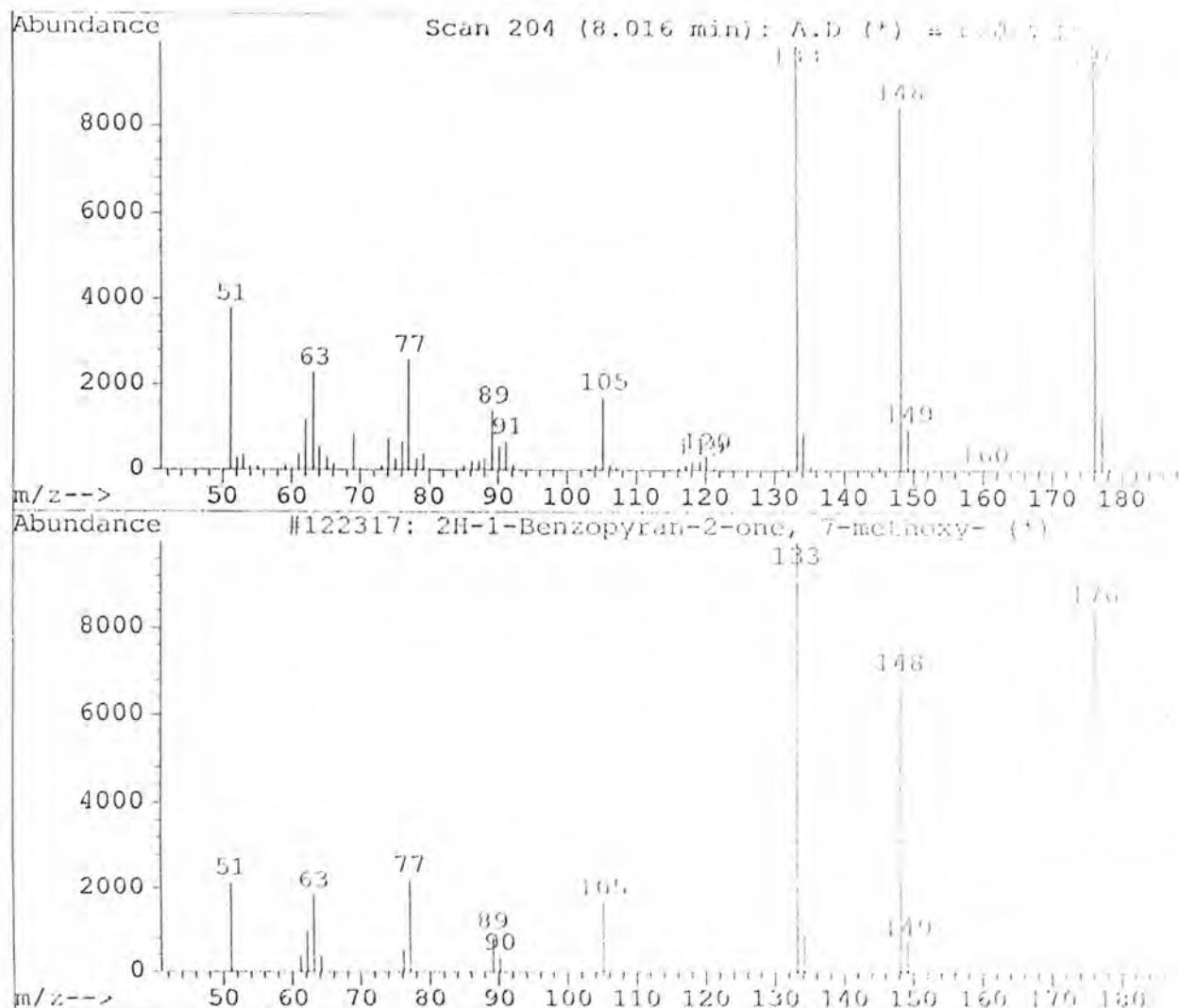
FT size 4095 x 512

Total time 13 minutes

Spektrum ¹³C-H cosy dari isolat II

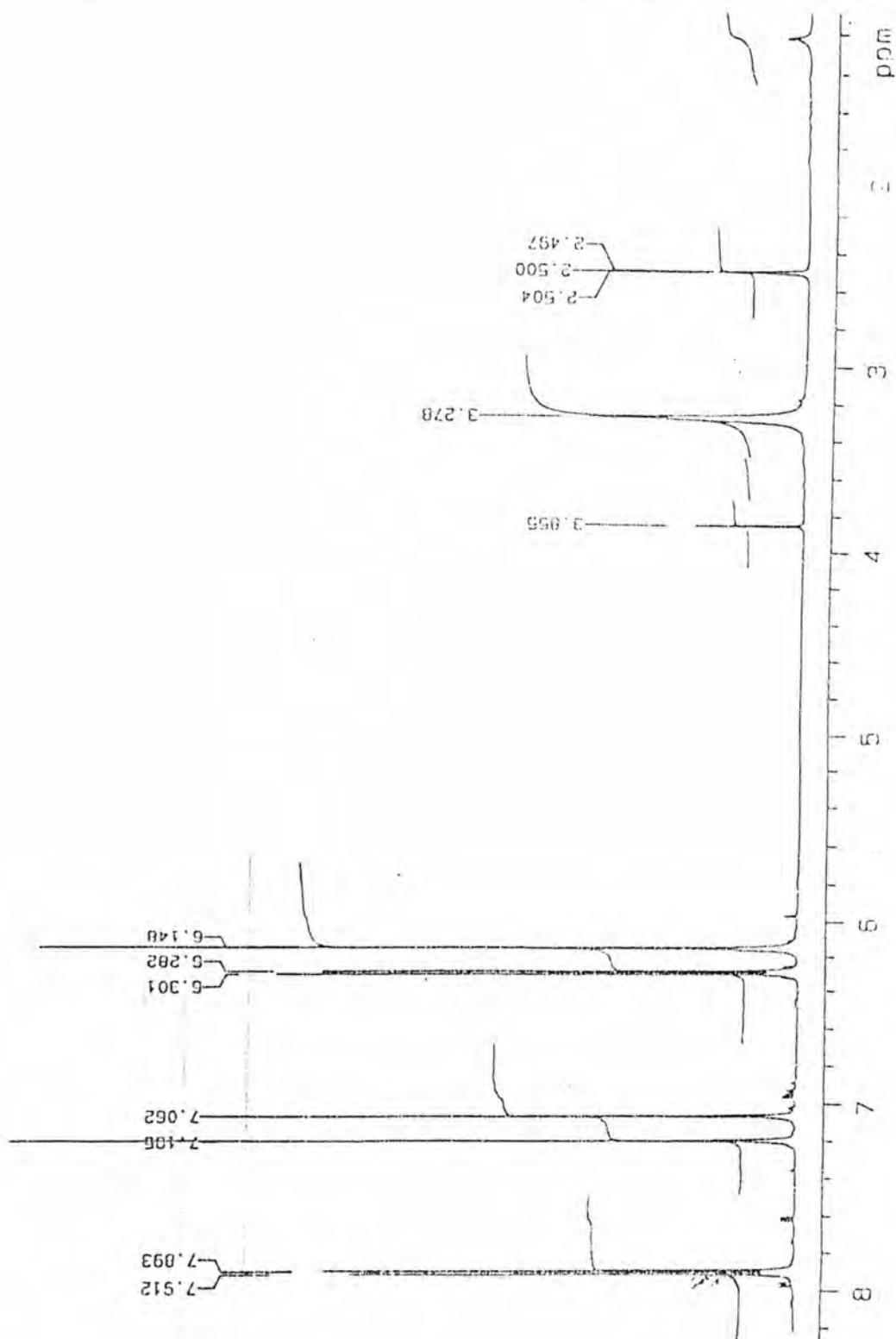
**Spektrum massa dari isolat II dibandingkan dengan
7-metoksi 2H-1-benzopiran-2-on**

Library Searched : C:\DATABASE\WILEY.L
 Quality : 98
 ID : 2H-1-Benzopyran-2-one, 7-methoxy-



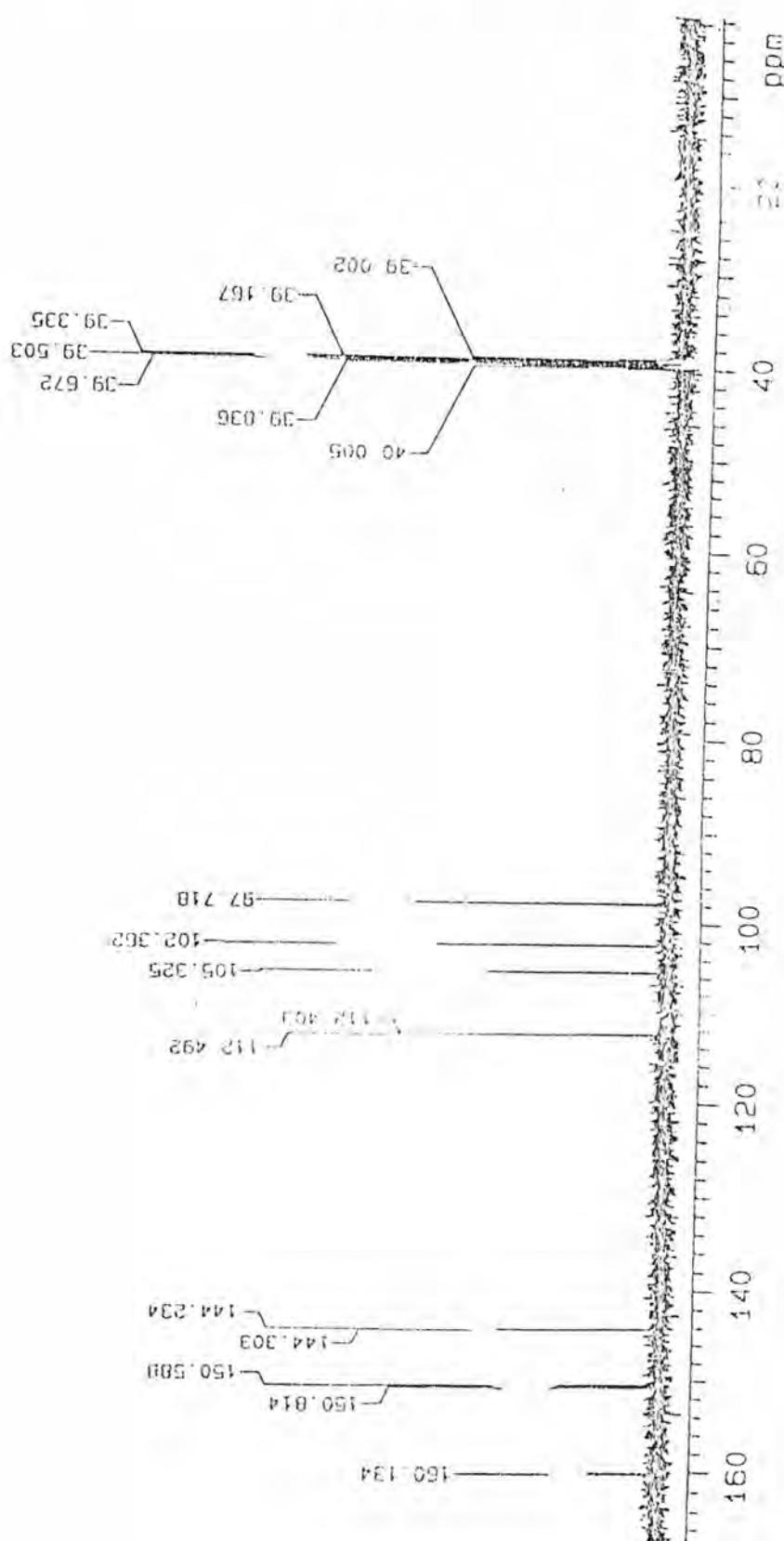
Lampiran : 20 a

Spektrum ^1H -RMI (500 Mhz.) dalam DMSO- d_6 pada 40,0 C/313,1 K dari isolat III

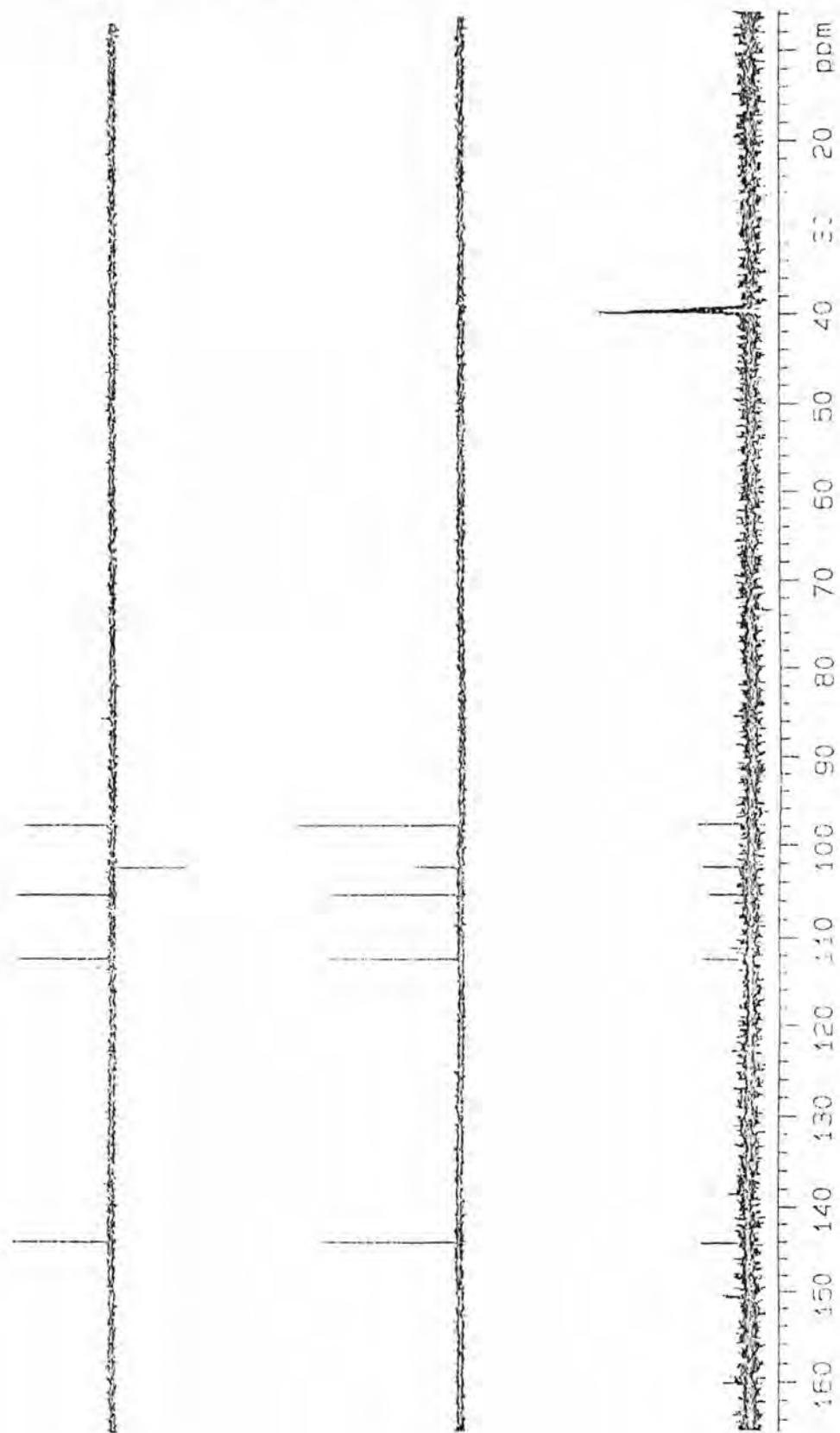


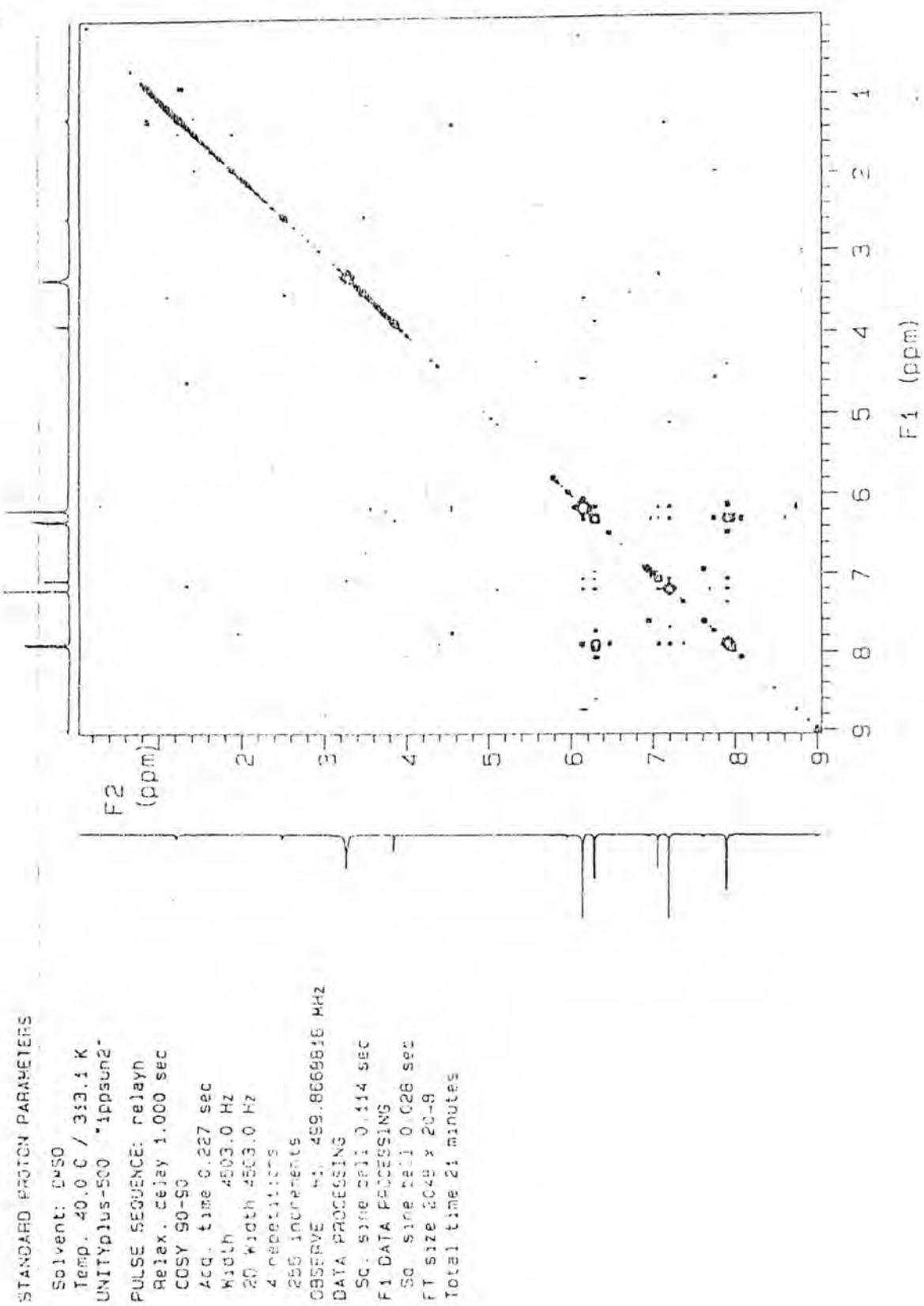
Lampiran : 20 b

Spektrum ^{13}C -RMI (125 Mhz.) dalam DMSO-d6 pada 40,0 C/313,1 K dari isolat III.



Spektrum DEPT dari isolat III



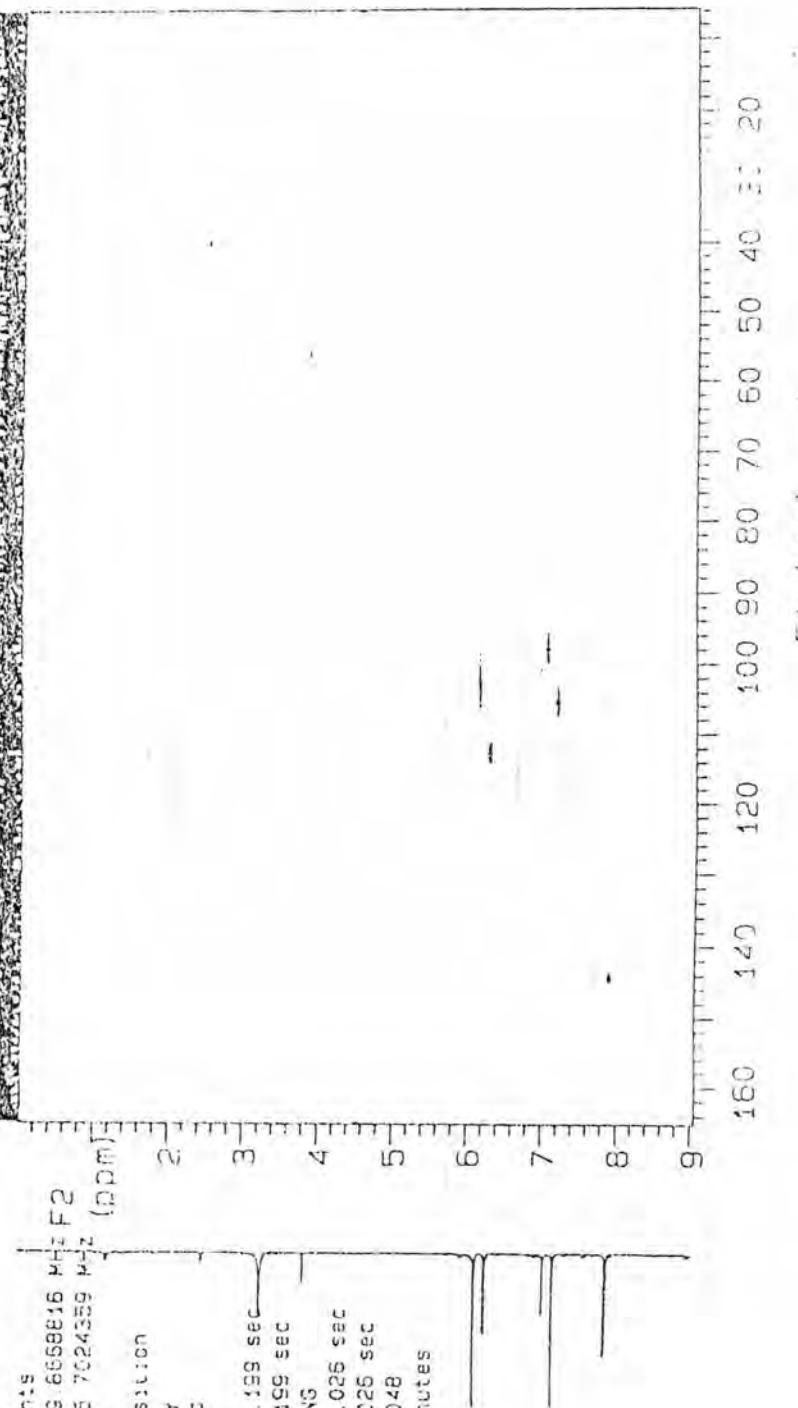
Spektrum ^1H - ^1H cosy dari isolat III

Lampiran : 20 e

Spektrum $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ cosy dari isolat III

STANDARD PROTON PARAMETERS

Solvent: DMSO
 Temp. 29.0 °C / 313.1 K
 User: 1-14-67
 UNITYPE-500 "1DPSUN2"
 PULSE SEQUENCE: ghsqc_da
 RF1ax . delay 1.162 sec
 Acc. time 0.199 sec
 Width 4503.0 Hz
 2D Width 20050.2 Hz
 Single scan
 2 x 512 increments
 OBSERVE H1, 499.6658816 Hz F2
 DECOUPLE C13, 125.7524359 Hz (ppm)
 power 45 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.159 sec
 Shifted by -0.159 sec
 F_1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.026 sec
 Shifted by -0.026 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 24 minutes



Spektrum massa dari isolat III dibandingkan dengan
8-hidroksi-4,6-dimetil kumarin

Library Searched : C:\DATABASE\WILEY.L
 Quality : 83
 ID : 8-Hydroxy-4,6-dimethylcoumarin

