

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang malaria

2.1.1. Penyakit malaria dan permasalahannya

Penyakit malaria telah diketahui sejak zaman 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 banyak 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 Chwatt, 1986; Gandahusada dkk, 1990).

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit bersel tunggal yaitu Protozoa, termasuk genus Plasmodium, yang mempunyai habitat di dalam sel darah merah dan sel hati. Dikenal 4 spesies yang bersifat parasitik bagi manusia, yaitu: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale*. Dari spesies-spesies tersebut yang paling umum menginfeksi manusia di daerah tropik dan sub tropik adalah *P.falciparum*, yang juga penyebab malaria paling berbahaya, yaitu : malaria subtertiana (malaria maligna, malaria tropika, malaria falsiparum) yang dapat menimbulkan kematian. 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; WHO, 1985; Bruce-Chwatt, 1986; Gandahusada dkk, 1990).

2.1.2. *Plasmodium falciparum*.

2.1.2.1 Klasifikasi *Plasmodium falciparum*.

Menurut Boyd (1970), *P. falciparum* diklasifikasi sebagai berikut:

Filum : Protozoa

Sub filum : Plasmodium

Kelas : Sporozoa

Sub kelas : Telospora

Bangsa : Haemosporidia

Suku : Plasmodiidae

Marga : Plasmodium

Jenis : *Plasmodium falciparum* Welch.

Menurut Whittaker, Plasmodium termasuk dalam filum Apicomplexa dari dunia Protoctista (Roberts dkk, 1993).

3.1.2.2. Morfologi dan daur hidup *P. falciparum*.

Daur hidup *P. falciparum* terdiri dari :

3.1.2.2.1. Fase aseksual (skizogoni) dalam hospes vertebrata (hospes intermediate, hospes perantara).

Fase aseksual mempunyai 2 daur yaitu :

3.1.2.2.1.1. Daur dalam sel parenkim hati (skizogoni eksoeritrosit) atau stadium jaringan dengan hanya ada skizogoni pra-eritrosit (skizogoni eksoeritrosit primer)

Fase berlangsung antara 5 1/2 -7 hari, dimulai setelah nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung parasit malaria menusuk hospes, sporozoit di dalam air liurnya masuk ke dalam peredaran darah dan setelah 1/2-1 jam masuk ke dalam sel hati. Sebagian dihancurkan oleh fagosit, sebagian masuk ke dalam sel hati dan berkembang biak.

Inti parasit membelah diri berulang-ulang dan skizon jaringan berbentuk bulat atau lonjong, membesar dengan ukuran 60 μm . Pembelahan inti diikuti pembelahan sitoplasma sehingga terbentuk beribu-ribu merozoit berinti satu. Pada akhir fase pra-eritrosit, skizon pecah, merozoit keluar dan masuk di peredaran darah. Sebagian besar menyerang eritrosit yang berada di sinusoid hati, dan beberapa diantaranya dimusnahkan oleh fagosit.

2.1.2.2.1.2. Daur eritrosit dalam darah (skizogoni eritrosit).

Merozoit yang dilepaskan oleh skizon jaringan kemudian menyerang eritrosit. Stadium termuda terdapat dalam darah tepi, biasanya berbentuk cincin, yang masih muda berukuran seperenam diameter eritrosit dan selama pertumbuhan bentuknya berubah menjadi tidak teratur. Stadium muda ini disebut : trofozoit. Kemudian bentuk cincin menjadi lebih besar dengan ukuran seperempat sampai setengah diameter eritrosit. Parasit mencernakan hemoglobin dan sisa metabolismenya berupa pigmen malaria yang merupakan kombinasi protein dan hematin. Pada stadium lanjut pigmen terlihat berupa butir-butir berwarna kuning tengguli hitam. Di dalam satu sel sering ditemukan beberapa bentuk cincin (infeksi multipel).

Dalam waktu 24 jam parasit di dalam kapiler berkembang biak secara skizogoni. Bila skizon matang akan menduduki dua pertiga bagian eritrosit, akhirnya membentuk 8-24 merozoit, rata-rata 16 merozoit. Skizogoni selesai dalam waktu 48 jam dan periodisitasnya

khas tertiana. Seringkali terdapat dua atau lebih kelompok-kelompok parasit dengan sporulasi yang tidak sinkron, maka periodisitas gejala pada penderita tak teratur, terutama pada stadium permulaan serangan malaria.

Stadium selanjutnya pada umumnya tak ditemukan di dalam darah tepi, kecuali pada kasus infeksi berat.

Bentuk cincin dan trofozoit yang lebih tua biasanya setelah 24 jam menghilang dari darah tepi dan tertahan di kapiler alat-alat dalam seperti : otak, jantung, plasenta, limpa, usus atau sumsum tulang ; di tempat tersebut parasit mengalami perkembangan selanjutnya.

Setelah 2 atau 3 generasi pembentukan merozoit, terjadi gametogoni atau gametogenesis.

Gametosit muda berbentuk agak lonjong, kemudian menjadi lebih panjang atau seperti elips, setelah matang bentuk khas sabit atau pisang. Gametosit betina atau makrogamet bentuk lebih panjang daripada mikrogamet atau gamet jantan yang berbentuk seperti sosis.

Jumlah gametosit kadang-kadang sampai 50.000-150.000/mm³ darah.

2.1.2.2.2. Fase seksual dalam hospes definitif

Siklus pada nyamuk berlangsung 22 hari pada suhu 20° C, 15-17hari pada suhu 23° C, dan 10-11 hari pada 25° C.

Nyamuk *Anopheles* betina menghisap darah hospes manusia yang mengandung parasit malaria, maka parasit aseksual dicernakan bersama eritrosit dan gametosit dapat tumbuh terus. Inti pada mikrogametosit membelah menjadi 4-8 dan masing-masing menjadi bentuk panjang seperti benang (flagel) dengan ukuran 20-25 μ , menonjol keluar dari sel induk, bergerak-gerak sebentar dan kemudian melepaskan diri. Proses ini disebut : proses

eksflagilasi dan berlangsung hanya beberapa menit pada suhu yang sesuai. Flagel atau gamet jantan disebut mikrogamet.

Makrogametosit setelah matang menjadi gamet betina atau makrogamet.

Dalam lambung nyamuk mikrogamet tertarik oleh makrogamet yang membentuk tonjolan kecil tempat masuk mikrogamet sehingga terjadi pembuahan yang menghasilkan zigot.

Zigot mula-mula berbentuk bulat dan tidak bergerak tetapi setelah 18-24 jam menjadi ookinet yang berbentuk panjang dan dapat bergerak.

Ookinet menembus dinding lambung melalui sel epitel ke permukaan luar lambung menjadi ookista yang berbentuk bulat. Jumlah ookista sampai beberapa ratus buah. Ookista makin membesar dan merupakan bulatan-bulatan semi' transparan mengandung butir-butir pigmen. Ookista membesar dan inti membelah-belah. Biasanya terjadi pada hari ke 8.

Inti yang sudah membelah dikelilingi protoplasma yang berbentuk memanjang dan kedua ujungnya runcing dengan inti di tengahnya (sporozoit). Ookista kemudian pecah dan ribuan sporozoit dilepaskan dan bergerak dalam rongga badan nyamuk untuk mencapai kelenjar liur. Bila nyamuk menghisap darah, mengeluarkan air liurnya untuk mencegah penggumpalan darah, sehingga sporozoit ikut masuk melalui luka tusuk ke dalam aliran darah hospes perantara (intermediate). (Jeffrey, 1968; Boyd, 1970; Gilman, 1985; Gandahusada dkk, 1990).

Daur hidup *P.falciparum* terlihat pada gambar : 2.1. (Lampiran : 1).

2.1.3. Gejala klinik dan diagnosis malaria falsiparum

Masa tunas intrinsik malaria falsiparum berkisar antara 9 - 14 hari. Gejala yang timbul dimulai dengan sakit kepala, punggung dan ekstremitas, rasa dingin, mual, muntah atau

diare ringan . Penyakit berlangsung terus, keadaan umum memburuk, gelisah, terjadi ketidak seimbangan mental. Demam tak teratur, tidak menunjukkan periodisitas yang jelas dan suhu tubuh dapat mencapai 40°C disertai konvulsi dan pneumonia. Banyak keringat keluar walaupun suhu tubuh turun. Pernafasan dan denyut nadi menjadi cepat, mual, muntah dan diare menjadi bertambah parah, kadang-kadang timbul serangan batuk karena kelainan dari paru-paru. Limpa membesar, juga hati membesar disertai ikterus ringan Di dalam urin ditemukan albumin dan hialin dan torak granuler. Terjadi anemia ringan dan leukopenia dengan monositosis. Kadang-kadang terjadi koagulopati intravaskular dengan pendarahan spontan.

Pada malaria falsiparum berat dapat terjadi :

- 1). Hiperparasitemia dengan lebih dari 5% eritrosit dihinggapi parasit.
- 2). Malaria serebral dengan kesadaran menurun
- 3). Anemia berat dengan kadar Hb $< 7,1$ g%.
- 4). Ikterus dengan bilirubin dalam serum $> 50\mu\text{mol/L}$.
- 5). Gagal ginjal dengan kreatinin dalam serum $> 3,0$ g% dan urine < 400 mL/24 jam
- 6) Hipertermia dengan suhu tubuh $> 39^{\circ}\text{C}$.
- 7) Syok hipotensi.

Diagnosis malaria falsiparum dapat dibuat dengan menemukan parasit stadium trofozoit muda (bentuk cincin) tanpa atau dengan stadium gametosit dalam sediaan darah tepi (Bruce Chwatt, 1978; Gandahusada, 1990).



2.1.4. Pengobatan terhadap malaria

Pengobatan malaria didasarkan atas biologi infeksi, dan dibagi dalam 5 kategori, yaitu:

2.1.4.1. Pencegahan kausal (profilaksi).

Mencegah terjadinya serangan klinik dengan mematikan sporozoit, sehingga infeksi dapat dicegah dari awal. Pencegahan ini juga menghalangi transmisi dari manusia ke nyamuk.

Obat yang digunakan antara lain : primakin, kloroguanid, pirimetamin.

2.1.4.2. Pengobatan supresi:

Dimaksudkan untuk menghambat perkembangan parasit dalam fase eritrosit, sehingga penderita bebas dari serangan klinik, tetapi infeksi tidak dicegah, dan fase ekso-eritrosit tetap berlangsung. Obat yang digunakan ialah : klorokin, kloroguanid, pirimetamin.

2.1.4.3. Pengendalian serangan klinik.

Obat ini dinamakan skizoritosid, karena menghentikan proses skizogoni sehingga serangan klinik terhenti. Obat yang digunakan ialah : kuinina, klorokin, amodiakin, kloroguanid, pirimetamin, tetrasiklin.

2.1.4.4. Gametositosidal

Memusnahkan bentuk gamet parasit malaria, sehingga penularan melalui nyamuk terhindar. Obat yang digunakan untuk pencegahan kausal, supresi dan serangan klinik semuanya mencegah perkembangan gamet di dalam darah.

2.1.4.5. Pengobatan radikal :

Memusnahkan parasit dalam fase eritrosit maupun ekso-eritrosit. Obat yang digunakan ialah : 8-aminokinolin. (Gan, dkk, 1987)

2.2. Tumbuh-tumbuhan sebagai obat antimalaria

Tumbuhan-tumbuhan banyak yang digunakan sebagai obat antimalaria.

Obat antimalaria yang tertua ialah kuinina dari kulit pohon kina (*Cinchona sp.*) yang dikenal semenjak abad ke-17. Kemajuan di bidang kimia sintetik menyebabkan kuinina digantikan dengan obat malaria sintetik, seperti klorokuin, amodiakuin dan lainnya.

Timbulnya resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin dan beberapa obat sintetik lain memicu ilmuwan berpaling kembali kepada tumbuhan untuk mencari obat lain dengan mekanisme kerja yang berlainan, disamping juga mengembangkan antigen dan vaksin malaria.

Semenjak tahun 1947 telah dilakukan penapisan ("screening") aktivitas *in vivo* terhadap *P. gallinaceum* dalam ayam dan terhadap *P. cathemerium* dan *P. lophurae* dalam bebek, terhadap lebih dari 600 jenis tumbuhan dari 126 suku. Ternyata 33 jenis tumbuhan memberikan hasil positif, di antaranya yang paling potensial ialah dari suku Amaryllidaceae dan Simarubaceae. Antimalaria pada burung tidak merupakan indikator antimalaria pada manusia, karena itu pada tahun 1947 tidak ada tindak lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif antimalaria tersebut (O'Neill dkk, 1985; Phillipson 1991).

Kemajuan yang telah dicapai dalam metoda pembiakan *P. falciparum in vitro* membawa pula kemajuan dalam penelitian obat malaria baru, baik yang sintetik maupun yang berasal dari bahan alam. Penelitian telah dilakukan di beberapa negara, antara lain di India, Thailand, Tanzania dan negara Afrika lainnya, juga Amerika Latin, bahkan juga di negara industri maju seperti Amerika.

Dari beberapa tumbuhan telah berhasil diisolasi senyawa yang berkhasiat sebagai antimalaria terhadap *P. falciparum in vitro* atau *P. berghei in vivo* dalam mencit.

Senyawa-senyawa tersebut ialah :

- | | |
|----------------------------|--|
| 2.2.1. Golongan alkaloid | 2.2.3. Golongan kumarin dan lignan |
| 2.2.2. Golongan terpenoid. | 2.2.4. Golongan antranoid, khalkon dan flavonoid |

Selain metabolit sekunder dari tumbuhan tinggi tersebut, beberapa antibiotika dari biakan mikroorganisma juga bersifat antimalaria. (Broto Sutaryo, 1994). Senyawa antimalaria yang berhasil diisolasi dari tumbuhan tertera dalam Tabel : 2.1. (Lampiran:2).

2.3. Tinjauan tentang *E. triplinerve* Vahl.

2.3.1. Pertelaan tumbuhan

Nama Eupatorium telah digunakan sejak zaman dahulu. Pada waktu itu Eupatorium adalah nama tumbuhan yang ditulis oleh Dioscorides Medicus dalam De Materia medica, dan sekarang tumbuhan tersebut dikenal dengan nama *Agrimonia eupatoria* L. Marga Eupatorium termasuk dalam Eupatoriae salah satu dari 13 tribus Asteraceae. Kini dikenal 44 jenis Eupatorium (Woerdenbag, 1993).

2.3.1.1. Klasifikasi:

Menurut Burkill (1935) klasifikasi *E. triplinerve* adalah sebagai berikut:

- Filum : Spermatophyta
- Sub filum : Magnoliophytinae (Angiospermae)
- Kelas : Magnoliata e (Dicotyledoneae)
- Sub kelas : Asteridae

Bangsa : Asterales
 Suku : Asteraceae (Compositae)
 Tribus : Eupatorieae
 Marga : Eupatorium
 Jenis : *Eupatorium triplinerve* Vahl.

2.3.1.2. Sinonim :

Backer (1963) menyatakan bahwa *E. triplinerve* sinonim dengan *E. ayapana* Vent.ex. Millin. Nadkarni (1978) menyatakan bahwa sinonim dengan *E. perfoliatum* dan *E. aromaticus*, tetapi telaah Dymock (1890) tentang *E. perfoliatum* tidak sama dengan pertelaan tentang *E. triplinerve*. Pertelaan tentang *E. triplinerve* menurut Hegnauer tidak sama dengan pertelaan tentang *E. aromatica* (Hegnauer 1964). Menurut Woerdenbag (1993) *E. triplinerve* tidak sama dengan *E. aromatica*.

2.3.1.3. Nama daerah:

Pada umumnya di Indonesia *E. triplinerve* dikenal sebagai daun prasman (Mardisiswoyo, 1975). Di Jawa dikenal sebagai jukut prasman (Sunda), godong prasman, rajapanah, dayaprana, jepana, teklan, daun panahan, daun fransman.

Di Sumatra dikenal sebagai accrang, daun panahan atau daun prasman. (Kloppenburger-Versteegh, 1935; Heyne, 1950).

2.3.1.4. Ekologi dan penyebaran:

Berasal dari Amerika tropik (Brazilia) dan ditemukan tumbuh liar di daerah Amazon. Juga tersebar di Asia tropik, Afrika, Brazilia, Guiana, Hindia Barat, Trinidad (Dymock, 1890). Menurut Woerdenbag, terbanyak ditemukan di Amerika Utara bagian Timur.

(Woerdenbag, 1993). Di Indonesia tumbuh liar di lereng-lereng gunung; dapat tumbuh baik di tempat terbuka maupun terlindung. Sering ditanam sebagai penutup tanah di perkebunan coklat dan teh, juga ditanam sebagai tanaman obat (Heyne, 1950; Mardisiswoyo, 1972).

2.3.1.5. Data morfologi:

Tumbuhan : berupa terna menahun, bau aromatik, rasa pahit aromatik.

Akar : Akar tunggang, masuk ke dalam tanah tidak terlalu dalam.

Batang : tumbuh merayap atau condong, tinggi 0,5-1 meter, banyak bercabang, pada buku-buku batang yang terletak di atas tanah tumbuh akar; berbatang basah, sedikit berkayu, kecil-kecil, berbulu bulat dengan diameter 1,5-3 mm, tak berbulu, warna kemerahan, beruas-ruas, panjang ruas 2-7,5 cm, pada tiap buku terdapat dua helai daun. Batang yang masih muda licin, bagian ujung sedikit berbulu.

Daun : Tunggal, duduk berhadapan-bersilang, bentuk daun seperti lanset atau sempit memanjang, tepi daun rata, pangkal daun runcing, ujung daun meruncing; daging daun seperti kertas, warna hijau kemerahan, permukaan daun gundul, kadang-kadang sedikit berbulu. Tulang daun menyirip, ibu tulang daun bagian bawah permukaan bawah agak menonjol, warna kemerahan. Panjang daun 3-12 cm, lebar 0,5-2,5 cm, tangkai daun pendek, panjang tangkai sampai 10 mm. Daun yang ada di bagian atas cabang makin kecil, panjang 3-3,5 cm, lebar 5-6 cm. Pada ketiak daun terdapat cabang yang berdaun, pada bagian bawah terdapat dua daun berhadapan. Daun-daun pada cabang yang berbunga bentuk lebih sempit daripada daun pada cabang steril.

Bunga : Karangan bunga bentuk malai lebar, kecil dan terdapat pada ujung cabang dan pada ketiak daun. Pada ketiak daun hanya terdapat 2-6 bunga. Bunga majemuk bentuk bunga cawan, jumlah bunga 20-50, panjang 6-7 mm, ibu tangkai bunga panjang 3-5 cm. Kelopak bunga lepas bentuk seperti bulu, warna hijau keunguan, mahkota bunga berwarna putih, kecil, panjang 3,5-5 mm, bentuk jarum, berbulu putih, ujung berwarna coklat; benang sari kecil, lepas, kadang-kadang sebagian berlekatan. Backer menyatakan bahwa di Jawa jarang dapat berbunga (Backer 1963).

Buah : berupa buah kendaga.

Perbanyakan : dengan biji atau stek (Dymock, 1890; Heyne, 1950; Van Steenis-Kruseman, 1953; Backer 1963).



Gambar : 2.2. Tumbuhan *E. triplinerve* Vahl.

2.3.2. Kandungan kimia *E. triplinerve*.

Dari penelitian terdahulu ditemukan bahwa *E. triplinerve* mengandung minyak atsiri dan senyawa kumarin yaitu : ayapin (6,7-dioksi metilen kumarin), ayapanin (herniarin = 7-metoksi kumarin) dafnetin dimetil eter, hidrangetin, dafnetin-7-metil eter, umbeliferon dan dafnetin. (Dymock, 1890; Nadkarni, 1890; Burkill, 1932; Bose, 1936; Heyne, 1950; Van

Steenis-Kruseman 1953; Ayensu, 1981; Chaturvedi, 1989; Diem Trang, 1992, Woerdenbag, 1993; Chairul 1996). Minyak atsiri dari daun terutama mengandung timohidrokuinondimetil eter, timokuinon dan metil timil eter (Diem Trang 1992), selain itu juga mengandung β -selinen (Jain, 1976) dan yang tumbuh di India mengandung sineol (Data NAPRALERT, 1993; "Personal communication") Garg dan Nakhare (1991) menyatakan bahwa minyak atsiri dari bunga *E. triplinerve* mengandung 39 senyawa terutama timohidrokuinon dimetil eter.

2.3.2.1. Penggunaan:

Di Indonesia terutama di Jawa rebusan daun sebagai obat dalam digunakan untuk pengobatan seraiwan mulut, busung lapar, haid tak teratur, jantung, borok, nyeri kepala, influenza, malaria, penyakit paru-paru, sebagai sudorifika atau tonika, obat diare. Sebagai obat luar digunakan untuk membersihkan luka, pengobatan gigitan serangga berbisa dan ditempelkan di dahi pada penderita panas (Kloppenburger-Versteegh, 1915; Heyne, 1950; Van Steenis, 1953).

Di India rebusan herba termasuk bunganya digunakan sebagai tonika pahit, ekspektoran, antiperiodik, hemostatika dan stimulasi, antiskorbut, kelainan lambung dan perut, diare, antidota terhadap gigitan ular berbisa (Dymock, 1972; Nadkarni, 1978).

Di Argentina, Brazilia dan kepulauan Mauritius digunakan juga sebagai obat (Garg, 1991; Woerdenbag, 1993).

2.3.2.2 Daya farmakologik:

Minyak atsiri dari *E. ayapana* bersifat antifungi, sedangkan Garg & Nakhare (1991) menyatakan bahwa minyak atsiri dari bunganya in vitro efektif terhadap : *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Ascaris lumbricoides* dan *Taenia solium* (Data NAPRALERT, 1993, "Personal communication").

2.4. Kemotaksonomi

Dunia tumbuhan kecuali diklasifikasi berdasarkan filogenetik, juga sering dikelompokkan berdasarkan senyawa kimia yang dikandungnya (kemotaksonomi). Berdasarkan kemotaksonomi, *E. triplinerve* termasuk dari sub suku Tubuliflorae, tribus Eupatorieae, sedangkan *Artemisia annua* masuk tribus Anthemideae. Kebanyakan tribus Eupatorieae dan Anthemideae mengandung senyawa : minyak atsiri, seskuiterpenlaktone, diterpen, triterpen, saponin, karotenoid, senyawa asetil dan poli-en, alkaloid, senyawa fenol (kumarin, flavonoid), gula, polisakarida, asam-asam organik (Hegnauer, 1964). Woerdenbag (1993) menyatakan bahwa kandungan kimia yang khas dalam marga Eupatorieae ialah : terpenoid (seskuiterpenlaktone, triterpen), flavonoid, alkaloid pirolisidina, dan minyak atsiri. Namun demikian kandungan kimia tersebut bervariasi dalam masing-masing jenis. Ada jenis yang mengandung banyak seskuiterpenlaktone, tetapi ada yang sama sekali tidak mengandung seskuiterpenlaktone, demikian pula dengan senyawa lainnya.

2.5. Hubungan struktur dengan aktivitas.

Pada akhir abad ke 19 Ehrlich dan Langley mencetuskan konsep reseptor, yaitu suatu molekul yang khas di mana obat dengan struktur yang khas dapat berinteraksi sehingga menimbulkan respon biologik. Reseptor dapat berupa senyawa protein atau non protein yang sebagian besar terdapat di dalam membran plasma. Obat yang potensial, mempunyai bagian struktur yang khas yang berikatan dengan bagian dari reseptor yang sesuai. Bagian struktur yang khas tersebut disebut ligan.

Ligan dibedakan menjadi 2 macam, yaitu : agonis dan antagonis.

Agonis adalah ligan yang dapat memberikan respon biologik, dibedakan menjadi :

1. Agonis penuh, artinya pada kadar yang cukup memberikan respon biologik penuh.
2. Agonis parsial, yang hanya dapat menghasilkan sebagian respon biologik tidak tergantung pada kadarnya.

Antagonis mengikat reseptor, tetapi tidak memberikan respon biologiknya sendiri, namun demikian dapat menghambat suatu agonis sehingga tidak dapat mengikat reseptornya

Antagonis dibedakan menjadi :

1. Antagonis kompetitif, mengikat reseptor yang sama dengan agonis.
2. Antagonis nonkompetitif, menghasilkan efek dengan mengikat reseptor lain tetapi yang masih berkaitan.

Bentuk ikatan antara ligan dengan reseptor dapat berupa ikatan kovalen, interaksi elektrostatik, redistribusi muatan ion, daya Van der Waals atau daya "Entropy" (Taylor, 1993).

Senyawa penuntun (“Lead structure”) antimalaria dari tumbuhan yang terbaru diteliti adalah artemisinin (“qinghaosu”) yang ditemukan dalam tumbuhan *Artemisia annua*. Artemisinin adalah senyawa seskuiterpenlakton. Senyawa lain dari tumbuhan yang telah diketahui bersifat sebagai antimalaria antara lain: kumarin, terpenoid, flavonoid, alkaloid pirolisidina. (Broto Sutaryo, 1994)

E. triplinerve termasuk tribus Eupatorieae sub suku Tubulifloreae. Kebanyakan tumbuhan tribus Eupatorieae mengandung senyawa seskuiterpenlakton, flavonoid, alkaloid pirolisidina, triterpen dan minyak atsiri. (Hegnauer, 1964; Woerdenbag, 1993).

Senyawa-senyawa tersebut banyak ditemukan dalam tumbuhan marga Eupatorium.

Kandungan *E. triplinerve* yang sudah diketahui antara lain adalah senyawa kumarin.

Beberapa senyawa kumarin yang diisolasi dari tumbuhan dan sudah diketahui bersifat antimalaria ialah : 4-fenil kumarin , 5,6,7-trimetoksi kumarin, ostrutin, ostol, dafnetin. (Broto Sutaryo, 1994).

2.6. Kandungan kimia tribus Eupatorieae

Kandungan kimia Eupatorieae antara lain ialah : seskuiterpenlakton, kumarin, flavonoid, alkaloid pirolisidina. (Hegnauer, 1964; Woerdenbag, 1993).

2.6.1. Seskuiterpen lakton

Senyawa seskuiterpen terbentuk dari kondensasi 3 molekul isopren.

Seskuiterpen ditemukan banyak tersebar di dunia tumbuhan, disamping juga ditemukan pada Fungi dan di dunia binatang. Paralel dengan tersebar luasnya senyawa seskuiterpen, maka macam struktur kimianya juga sangat bervariasi .

2.6.1.1. Kegunaan dan aktivitas biologik

Beberapa senyawa seskuiterpen digunakan sebagai zat pahit, bersifat antiflogistik, spasmolitik, antiinflamasi, antimalaria, dan banyak yang telah diketahui bersifat sitotoksik dan digunakan sebagai antitumor. (Wagner, 1977; Broto Sutaryo, 1993).

2.6.1.2. Isolasi dan identifikasi seskuiterpenlakton

Seskuiterpenlakton dapat diekstraksi dengan kloroform, metanol atau etanol (Harborne, 1984). Untuk melihat adanya seskuiterpenlakton dengan cepat dilakukan dengan kromatografi lapis tipis sebagai fase diam silika gel G dan fase gerak campuran kloroform-eter (4:1), benzena-aseton (4:1), kloroform-metanol (99:1), dan benzena-metanol (9:1), benzena-eter(2:3), atau eter minyak bumi- CHCl_3 -etilasetat (2:2:1). laktone dideteksi dengan disemprot H_2SO_4 pekat dan dipanaskan $100^\circ\text{-}110^\circ\text{ C}$ selama lima menit. (Harborne, 1984).

2.6.2. Kumarin

Kumarin adalah senyawa benzo- α -piron, berupa laktone yang jika ditambah alkali akan terbuka menjadi cis-o-hidroksi asam sinamat, jika ditambah asam akan terbentuk kembali ikatan siklis. Senyawa kumarin ditemukan tersebar sangat luas dalam tumbuhan, terutama suku : Graminae, Orchidaceae, Leguminosae, Umbelliferae, Rutaceae, Labiatae (Farnsworth, 1966).

Berdasarkan struktur kimia, kumarin dapat diklasifikasikan menjadi :

- a. Kumarin sederhana
- b. C-prenil kumarin
- c. Kumarin terkondensasi dapat diklasifikasikan menjadi :



- c.1. furanokumarin :
 - c.1.1. tipe psoralen
 - c.1.2. tipe angelisin
- c.2. Piranokumarin :
 - c.2.1. tipe santiletin
 - c.2.2. tipe alosantoletin
 - c.2.3. tipe sesilin
- d. Kumarin dimer
- e. Furanokromon
- f. Lain-lain kumarin : novobiosin, aflatoksin

2.6.2.1. Kegunaan dan aktivitas biologik

Aktivitas farmakologik dan fisiologik senyawa kumarin antara lain ialah : mempengaruhi efek pertumbuhan dari tumbuhan, antikoagulan, meningkatkan sensitivitas kulit, estrogenik, vasodilator, diuretik, antikholerostatik, hipnotik, antispasmodik, antiaterosklerotik, efek hipotermal, sedatif, analgesik, antibakteri, fungistatik, moluskasidal, antelmintik, rodentisida, mempunyai sifat sebagai antibiotik, hepatotoksik, karsinogenik, antimalaria, sebagai penyedap makanan dan sebagai tabir surya bagi kulit. (Soine, 1964; Wagner dkk, 1983; Wagner, 1985).

2.6.6.2. Identifikasi kumarin

Kumarin dapat dideteksi dari tumbuhan dengan cara menambahkan larutan alkali (Sodium hidroksida), kemudian dilihat dengan sinar ultra violet akan terlihat fluoresensi hijau kekuningan atau hijau keunguan. Hal ini disebabkan karena dengan penambahan alkali, cincin lakton terbuka dan menjadi bentuk anion asam kumarinat. Setelah disemprot dengan larutan alkali bentuk anion asam kumarinat akan segera memberikan fluoresensi yang jelas pada sinar ultra violet (Farnsworth, 1966; Macek, 1972). Karena

memperlihatkan fluoresensi kuat, maka mudah ditunjukkan secara kromatografi (Wagner, 1985).

2.6.3. Alkaloid pirolisidina

Alkaloid berupa senyawa yang mengandung unsur N pada inti.

Alkaloid pirolisidina banyak tersebar dalam dunia tumbuhan, tetapi merupakan kandungan khas dari *Senecio sp* (Asteraceae), *Crotalaria sp.* (Leguminosae) dan beberapa genera dari suku Boraginaceae.

2.6.3.1. Sifat farmakologik dan kegunaan

Alkaloid pirolisidina bersifat hepatotoksik, sitotoksik dan ada yang bersifat antimalaria (Wagner, 1977; Vickery, 1981; Broto Sutaryo, 1993).

2.6.3.2. Identifikasi alkaloid

Identifikasi alkaloid dalam tumbuhan pada prinsipnya dapat dilakukan sebagai berikut: Simplisia yang mengandung alkaloid diekstraksi dengan pelarut alkohol yang bersifat asam lemah (HCl 1M atau asam asetat 10%), kemudian diendapkan dengan amonia pekat. Terhadap endapan yang terjadi dilakukan identifikasi dengan KLT dengan pelat silika gel G dan pengembang metanol-NH₄OH pekat (200:3). Deteksi dengan penyemprot pereaksi Dragendorff atau pereaksi alkaloid lain, dan dilihat di bawah sinar UV. (Harborne, 1984).

2.6.4. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar dan terdapat dalam semua tumbuhan hijau. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid terdapat dalam berbagai bentuk struktur, semua mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun

dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga. Dalam tumbuhan, flavonoid umumnya terikat pada gula sebagai glikosida dan mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida. (Harborne, 1984).

Flavonoid dapat dibedakan menjadi beberapa golongan, yaitu

- | | |
|------------------------|-----------------|
| a. antosianin | e. flavanon |
| b. flavon dan flavonol | f. biflavonoid |
| c. khalkon | g. isoflavonoid |
| d. auron | |

2.6.4.1. Kegunaan dan aktivitas biologik

Flavonoid ada yang bersifat oestrogenik, ada yang digunakan sebagai antimikroba, anti jamur, insektisida juga sebagai antimalaria (Harborne, 1984; Broto Sutaryo, 1994).

2.6.4.2. Identifikasi flavonoid

Dalam satu tumbuhan flavonoid mungkin terdapat dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida, maka untuk identifikasi dalam tumbuhan dilakukan identifikasi aglikon yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan yang dihidrolisis terlebih dahulu.

Pada prinsipnya cara pemeriksaan aglikon flavonoid dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis adalah sebagai berikut: Simplisia direndam dalam HCL 2M, dipanaskan selama 30-40 menit pada 100° C. didinginkan, disaring dan diekstraksi dengan etil asetat. (Bila larutan berwarna, ekstrak dipanaskan dan diekstraksi ulang dengan sedikit amil alkohol). Etil asetat diuapkan sampai kering, ditambahkan etanol 1-2 tetes dan dilakukan

KLT dengan pelat silika gel G dengan 5 pengembang : Forestal (asam asetat-HCl pekat-air; 30:3:1), HOAc 50% (asam aseta 50% dalam air), BAA (n-butanol-asam asetat-air; 4:1:5; lapisan atas), PhOH (fenol jenuh dengan air)., deteksi dilakukan di bawah sinar UV, (Harborne, 1984).

2.7. Analisis Fitokimia

2.7.1. Isolasi dan pemurnian

Dari penelitian terhadap *E.triplinerve* yang terdahulu ditemukan senyawa : kumarin, minyak atsiri, terpenoid , karotenoid (Chaturvedi, 1989; Diem Trang, 1992; Bose, 1993; Woerdenbag, 1993; Chairul dkk, 1995).

Ekstraksi dilakukan dengan bermacam-macam pelarut, dari yang non polar (eter, eter minyak bumi) , semi polar (kloroform) sampai polar (etanol, metanol).

Metoda ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi atau sohxletasi.

Pemurnian kandungan senyawa kebanyakan dilakukan secara kromatografi kolom dan hasilnya dimurnikan dengan cara KLT atau KCKT.

2.7.2. Kromatografi

Kromatografi adalah proses pemisahan di dalam suatu sediaan dengan cara penyarian berfraksi, penyerapan atau penukaran ion pada zat berpori sebagai fase diam dengan menggunakan cairan atau gas mengalir sebagai fase bergerak.

Klasifikasi kromatografi dapat berdasarkan beberapa faktor yaitu: berdasarkan macam fase diam dan fase gerak (kromatografi cair-padat, gas-padat, cair-cair, gas-cair), berdasarkan mekanisme pemisahan (kromatografi serapan, partsisi, penukar ion, gel),

berdasarkan teknik pemisahan (kromatografi kolom dan bidang datar), berdasarkan macam “analyte” (kromatografi ion dan cair “fast protein”) (Sastrohamidjojo, 1985; Sudjadi, 1988; Robards dkk, 1994).

Kromatografi yang digunakan adalah : kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi cair kinerja tinggi dan kromatografi gas.

2.7.2.1.Kromatografi lapis tipis. (KLT)

KLT merupakan bentuk kromatografi cair-padat. Sebagai fase diam dapat berupa lempeng kaca atau logam yang dilapisi silika gel, aluminium oksida, kieselgur, serbuk selulosa, pati, poliamida atau sefadeks. Campuran yang akan dipisah ditotolkan berupa bercak atau pita pada fase diam. Kromatografi dilakukan di dalam bejana kaca yang tertutup rapat dan berisi larutan pengembang dalam keadaan jenuh.. Setelah proses pengembangan selesai , fase diam (lempeng) diambil dan dikeringkan , kemudian disemprot dengan penampak bercak.

Letak bercak dinyatakan dengan harga Rf atau hRf. ($hRf = 100 \times \text{harga Rf}$).

$Rf = \text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal} / \text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal.}$

KLT sering digunakan untuk mencari pelarut pada kromatografi kolom, menganalisa fraksi hasil kromatografi kolom, mengetahui arah reaksi, identifikasi dan isolasi senyawa murni skala kecil (Harborne, 1984).

2.7.2.2. Kromatografi kolom (KK)

Kromatografi kolom merupakan kromatografi serapan yang dapat digunakan untuk fraksinasi campuran senyawa dalam skala besar. Kolom berupa tabung kaca dengan keran

pada ujung bagian bawah. Kolom diisi dengan bahan penyerap misalnya silika gel sebagai fase diam dan dialiri pelarut sebagai fase gerak, kemudian cairannya dialirkan melalui bagian bawah sampai diperoleh fase tetap yang kompak, tidak terdapat udara di dalamnya. Campuran senyawa yang diuji ditambah sedikit fase gerak dan dicampur dengan sedikit fase diam sampai rata, dimasukkan melalui sebelah atas kolom. Selanjutnya dilakukan elusi dengan fase gerak. Umumnya fase gerak dimulai dari yang kurang polar ke yang paling polar. Perbandingan antara cuplikan dengan kolom yang baik antara 1 : 50 sampai 1 : 500 (Harborne, 1984).

2.7.2.3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT adalah kromatografi kolom jenis khusus dengan menggunakan cairan dengan tekanan tinggi sebagai fase gerak, dan fase diam terikat pada polimer berpori yang terdapat dalam kolom baja tahan karat.

Dibedakan dengan kromatografi kolom klasik karena mempunyai sifat khas, yaitu :

- Kolom pendek hingga mempersingkat waktu.
- Kolom sempit dengan diameter antara 1-3 mm, untuk memungkinkan pemisahan dalam jumlah mikro.
- Ukuran partikel bahan sorpsi di bawah 50 μm sehingga tercapai bilangan dasar teoretik yang tinggi.
- Pelarut elusi dialirkan ke dalam kolom dengan tekanan untuk mengkompensasikan tekanan arus dalam kolom.

Alat utama KCKT adalah : tandon pelarut, pipa, pompa, penyuntik, kolom, detektor, perekam.. (Harborne, 1984; Roth, 1988; Gritter, 1991).

2.7.2.4. Kromatografi gas

Kromatografi gas adalah suatu tehnik analisis yang didasarkan atas pemisahan fisik senyawa organik atau anorganik yang stabil pada pemanasan dan mudah diatsirikan. Kromatografi gas terdiri atas :

- Depo gas pembawa sebagai fase gerak, harus bersifat lembam dari segi kimia, dapat meminimumkan difusi gas, kemurniannya tinggi (misalnya : gas helium mempunyai kemurnian 99,95%) dan cocok dengan detektor yang digunakan.
- Gerbang suntik dimana suhu dapat diprogram (umumnya diatas 50^o di atas titik didih komponen yang dianalisis).
- Kolom kromatografi dapat dibuat dari baja nirkarat, aluminium dan kaca yang berbentuk lurus, lengkung atau melingkar. Umumnya dari baja nirkarat yang tak bereaksi dengan komponen senyawa yang dianalisis. Secara umum dapat dibedakan menjadi 2 jenis yaitu: kolom terpacking ("packed column") dan kolom terbuka /kapiler.
- Kontrol suhu.
- Detektor yang merupakan suatu sensor elektronik yang berfungsi merubah signal dari gas pembawa dan komponen-komponen di dalamnya menjadi signal elektronik (Mc. Nair, 1988; Mulya & Syahrani, 1992).

2.7.3. Spektroskopi

Elusidasi struktur isolat yang diperoleh dilakukan dengan pemeriksaan spektroskopi. Spektroskopi yang akan digunakan ialah : spektroskopi ultra violet, inframerah, resonansi

magnet inti dan spektroskopi massa.

2.7.3.1. Spektroskopi ultraviolet

Spektroskopi ultraviolet (UV) ialah pengukuran serapan radiasi elektromagnet pada daerah UV (190-380 nm). Spektroskopi ultraviolet digunakan untuk menganalisis struktur senyawa yang mempunyai sistem aromatik terkonjugasi. Identifikasi dilakukan dengan menggambarkan spektrum serapan larutan zat dalam pelarut untuk menetapkan letak serapan maksimum dan minimum. Panjang gelombang serapan maksimum dan minimum pada spektrum serapan yang diperoleh direkam (dalam nm), juga kekuatan absorbansi (keterserapan atau kerapatan optik) pada maksimum dan minimum yang khas. (Harborne, 1984; Roth, 1988).

2.7.3.2. Spektroskopi inframerah

Spektroskopi inframerah (IR) digunakan untuk mengetahui jenis gugus fungsional dalam suatu senyawa. Spektrum inframerah muncul sebagai pita dan letak pita dinyatakan dalam panjang gelombang (μm) atau dalam bilangan gelombang (cm^{-10}). Intensitas letak pita dinyatakan dalam transmitansi (T) atau absorbansi (A) yang harganya sama dengan $\log 1/T$. Spektrum tersebut merupakan sidik jari molekul sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus suatu senyawa. (Silverstein, 1981; Harborne, 1984; Roth, 1988;).

2.7.3.3. Spektroskopi Resonansi Magnet Inti (RMI).

Spektroskopi ^1H resonansi magnet inti (RMI) digunakan untuk mengetahui kerangka molekul dan jenis proton yang dimiliki senyawa. Radiasi elektromagnetik untuk studi spektroskopi ^1H RMI terletak pada daerah frekuensi antara 3×10^6 - 3×10^{10} Hz. Spektroskopi tersebut mempunyai beberapa parameter spektrum seperti : pergeseran

kimia, integrasi dan "splitting." Struktur kimia senyawa yang tidak diketahui dapat ditentukan dengan cara menggabungkan parameter spektrum RMI tersebut dengan data spektroskopi lainnya. Spektrum ^1H RMI terutama terlihat pada daerah antara 0-10 ppm medan di bawah tetrametilsilan (TMS). Untuk melarutkan senyawa yang diukur, digunakan bermacam-macam pelarut, antara lain CDCl_3 , DMSO-d_6 , piridina- d_5

Spektroskopi ^{13}C RMI beresonansi terutama pada daerah antara 0-200 ppm medan di bawah TMS. Setiap karbon yang berlainan menghasilkan satu sinyal. Rentangan geser kimia pada ^{13}C RMI untuk jenis karbonil, aromatik dan olefina terletak antara 90-210 ppm, sedangkan untuk jenis karbon alifatik, isoprenil terletak pada daerah 17-100 ppm (Markham, 1988; Williams, 1980).

2.7.3.4. Spektroskopi massa

Spektroskopi massa digunakan untuk mengukur massa molekul relatif atau bobot molekul dan mendeteksi pada bagian molekul organik yang sudah mengalami fragmentasi. Hasil spektrum massa merupakan sederetan sinyal pada kertas tertentu dan tersusun berdasarkan bobot molekul dari pecahan molekul yang diukur dan dinyatakan sebagai bobot molekul per muatan (m/z) atau massa per muatan (m/e).

Proses yang terjadi pada spektrometer massa ialah : perubahan bentuk molekul senyawa menjadi bentuk uapnya, perubahan molekul senyawa dalam bentuk uap menjadi ion, pemisahan ion yang terbentuk berdasarkan perbandingan massanya terhadap muatan dan identifikasi ion. Tehnik yang paling banyak digunakan untuk mengionkan molekul ialah tehnik "electron impact" (Williams, 1980; Munson, 1981; Harborne, 1984; Roth, 1988).

2.8. Uji aktivitas antimalaria

2.8.1. Metoda pembiakan *P. falciparum*

Biakan *P.falciparum* berdasarkan metoda Trager dan Jensen (1976) telah digunakan secara meluas dengan beberapa modifikasi .

Bahan-bahan dan teknik yang digunakan adalah sebagai berikut .

- 1) Medium RPMI 1640 yang dibuat oleh George Moore , kemudian ditambah dengan HEPES sebagai dapar dan 10% serum manusia . (Moore dkk, 1967).
- 2) Suatu lapisan sel darah merah manusia yang cocok dengan serum yang digunakan dengan kadar hematokrit bervariasi sekitar 1% dari tingkat yang biasa digunakan yaitu 5-8%.
- 3) Metoda penggantian medium dengan medium segar yang dapat dikerjakan secara manual minimal satu kali dalam sehari, ataupun secara otomatis untuk penggantian berkali-kali.
- 4) Fase gas dengan 3-5% CO₂ dan oksigen kurang dari 21% (kadar oksigen pada permukaan laut). Biasanya kadar oksigen yang dipakai berkisar antara 5-17%.
- 5) Suplai eritrosit segar secara sinambung tergantung kepada derajat pertumbuhan dan jumlah parasit. Pada keadaan hematokrit 5-8%, diperlukan maksimal 10-15 parasit per 100 sel darah merah. Pada hematokrit yang lebih rendah dapat diperoleh parasitemia yang lebih tinggi, walaupun jumlah parasit tidak bertambah. (WHO, 1977; Trager ,1978; Jensen, 1983).

Hal-hal tersebut dapat diperoleh dengan cara sebagai berikut:

Biakan dalam cawan petri dimasukkan ke dalam “candle jar” dengan penggantian medium

setiap hari. Fase gas dalam “candle jar” : 3% CO₂ dan 15-17% O₂.

Skala biakan dapat bervariasi dari sumur mikro, cawan petri yang dapat berisi 10 mL suspensi atau tabung yang lebih besar. Berbagai modifikasi metoda dasar tersebut telah dilakukan.

Berbeda dengan keadaan dalam tubuh manusia, parasit dalam biakan ini segera kehilangan sinkronitasnya dan belum ada metoda fisiologis yang dapat mencegahnya.

2.8.1.1. Sinkronisasi

Untuk melakukan uji aktivitas obat terhadap *P. falciparum* diperlukan biakan plasmodium yang sinkron. Sinkronisasi dapat dihasilkan dengan beberapa metoda buatan. Menurut Lambros dan Vanderberg (1979), biakan *P. falciparum* yang biasanya tidak sinkron dapat dibuat sinkron dengan cara mencuci eritrosit yang terinfeksi dalam larutan sorbitol 5%. Eritrosit yang tidak terinfeksi tidak dapat ditembus oleh sorbitol, tetapi dengan adanya pertumbuhan parasit yang mengakibatkan perubahan permeabilitas eritrosit, maka sorbitol dapat masuk ke dalam eritrosit yang mengandung stadium cincin akhir atau stadium yang lebih tua, sehingga terjadi lisis. Akhirnya suspensi sel yang terbentuk hanya yang mengandung parasit stadium cincin yang berumur 18 jam atau lebih muda. Pertumbuhan uniform yang lebih banyak dapat dihasilkan dengan menggunakan cara kombinasi antara pemisahan gelatin dengan sinkronisasi yang menggunakan sorbitol (Moore 1967; Jensen, 1983.), yaitu stadium skizon yang matang dipisahkan dahulu dengan fisiogel (larutan gelatin 5% dengan berat molekul rendah dalam Ringer laktat); kemudian pada biakan ini ditambahkan eritrosit yang baru selesai dicuci lalu biakan diletakkan dalam “candle jar”. Setelah 4 jam biakan disinkron dengan larutan sorbitol.

Dengan demikian maka eritrosit yang dihasilkan hanya mengandung stadium cincin yang baru masuk dan mempunyai periode pertumbuhan 4 jam atau kurang. (Da Silva, 1983) Sorbitol dapat diganti dengan manitol 5% (Osisanya, 1981).

2.8.1.2. Penyimpanan beku biakan ("Cryopreservation")

Prosedur ini merupakan modifikasi dari prosedur Rowe dkk, untuk menyimpan biakan dalam waktu lama. (Beales, 1981). Sebagai "cryoprotectant" ialah penambahan 70 mL gliserol kepada 180 mL sorbitol 4,2% dalam NaCl 0.85%, kemudian disterilkan melalui penyaring dengan diameter 0.45 μ m. Eritrosit yang mengandung parasit disentrifugasi dan medium biak dibuang. Pada sejumlah "cryoprotectant" ditambahkan "packed cell" dengan volume yang sama, dan dibiarkan sampai terjadi keseimbangan selama 5-10 menit pada suhu kamar. Sebanyak 0.5 mL suspensi dimasukkan ke dalam "vial" yang bertutup uliran dan steril, kemudian segera dibekukan dengan cara diaduk diputar dalam "alcohol-dry ice bath" atau N₂ cair. Setelah beku disimpan dalam pendingin N₂ cair. Bila akan dipakai, "vial" segera dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 37 ° C dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga tertutup steril. Sebanyak 0.5 mL NaCl 3.5% w/v ditambahkan kepada suspensi sel darah merah dalam gliserol dan disentrifugasi pada 500 putaran/menit selama 10 menit. Supernatan NaCl-gliserol dibuang dan ditambahkan lagi 0.25% NaCl 3.5% w/v. Setelah disentrifugasi, NaCl dibuang dan diganti dengan 0.5 mL medium RPMI 1640 yang mengandung serum manusia, suspensi disentrifugasi lagi seperti sebelumnya dan "supernatan" dipisahkan lagi. Kemudian endapan dicuci sekali lagi dengan 5 mL RPMI 1640 dan serum untuk menghilangkan semua NaCl dan gliserol. Sisa berupa "pellet" dicampur dengan eritrosit manusia yang baru dicuci dengan volume yang sama,

lalu diencerkan sehingga hematokrit 8% dengan menambahkan 6.0 mL medium RPMI lengkap. Medium biakan dibagi-bagi ke dalam cawan petri diameter 35 mm dan dimasukkan ke dalam desikator dengan tempat lilin seperti biasa (Pavanand, 1974; Reese 1976; Jensen, 1983).

2.8.1.3. Mencegah kontaminasi

Untuk menghambat kontaminasi bakteri dan fungus pada biakan *P.falciparum*, Osisanya dkk menambahkan 5-fluorositosin sebagai penghambat fungus, sedangkan Yayon menambahkan nistatin dan kloramfenikol untuk menghambat kontaminasi bakteri dan fungus. Penambahan nistatin dengan kadar 60 ug/mL tidak mengganggu parasit, dan penambahan 12-25 ug/ml nistatin ke dalam biakan yang telah terkontaminasi ternyata dapat menghilangkan sel-sel fungus (Osisanya, 1980; Yayon, 1984).

Kontaminasi bakteri pada biakan *P.falciparum* dapat pula dihilangkan dengan cara membuang mediumnya sebanyak mungkin lalu digantikan dengan medium segar yang mengandung kloramfenikol sampai 10 mg %. (bukan dengan gentamisin).

Suspensi yang terbentuk lalu diaduk sampai homogen dan diinkubasi pada 37 ° C selama 4 jam. Biakan segera dapat digunakan kembali karena bakteria tidak terlihat lagi pada pengamatan sediaan dengan pulasan Giemsa. Jika diperlukan biakan selanjutnya, maka medium dibuang kembali dan dicuci dengan RPMI-1640 sebelum diberi gentamisin, karena gentamisin dengan kloramfenikol dapat menghambat pertumbuhan *P.falciparum* secara sinergistik (Fairlamb, 1985; Morakote, 1988).

2.8.1.4. Manfaat biakan sebagai alat penelitian

Biakan *in vitro* dapat digunakan untuk :

- mempelajari sensitivitas parasit terhadap obat.
- mempelajari resistensi parasit terhadap obat.

Untuk mempelajari aktivitas obat maka metoda in vitro ini sangat menguntungkan , antara lain karena:

- 1) Biakan memungkinkan untuk mempelajari aktivitas intrinsik obat secara lebih hemat dan lebih cepat.
- 2) Pemberian dosis obat yang lebih tinggi dimungkinkan pada percobaan in vitro (pada percobaan in vivo sulit).
- 3) Pengaruh metabolisme hospes dihilangkan
- 4) Hanya memerlukan obat dalam jumlah kecil (terutama untuk obat yang sukar disintesis).
- 5) Mekanisme kerja obat dapat dipantau
- 6) Memudahkan skrining obat malaria baru
- 7) Memungkinkan pembuatan vaksin malaria.

(Trigg, 1976; Trager, 1976).

2.8.2. Pengujian efek antimalaria in vitro.

2.8.2.1. Metoda pengujian efek antimalaria .

Untuk pengujian efek antimalaria dari ekstrak tumbuhan dan isolat hasil kromatografi, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas tehnik dari Rieckmann dkk yang kemudian disempurnakan oleh WHO tahun 1982. (WHO, 1985).

Pada prinsipnya adalah sebagai berikut :

- Ekstrak atau isolat hasil kromatografi dilarutkan ke dalam dimetilsulfoksid (DMSO) kemudian 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 0,45 um dan diencerkan secara seri.

Inkubasi dilakukan di dalam lempeng sumur mikro yang berisi 96 sumur.

Masing-masing sumur diisi dengan larutan obat dengan bermacam-macam kadar.

Ke dalam sumur yang berisi obat ditambahkan 20 uL suspensi 10% eritrosit dengan parasitemia 1.0% sehingga masing-masing sumur berisi 200 uL medium yang mengandung serum dan obat yang diteliti. Dari blanko yang dibuat ternyata 0.1% DMSO atau 0.4% etanol tidak mempengaruhi biakan plasmodium.

Harus dijaga jangan sampai ada endapan ekstrak atau obat pada media biakan. Lempeng sumur mikro diletakkan dalam desikator kaca yang diberi lilin. Lilin dinyalakan, desikator ditutup, sementara kran udara pada tutup desikator dibuka.

Setelah lilin hampir padam, kran udara ditutup, inkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C selama 24 jam atau 48 jam tergantung macam uji (Geary, 1983; Sudaratana, 1985; Khalid, 1986; Wernsdorfer, 1988; Ratsimananga, 1991; DEPKES R.I. 1991;)

Untuk "skizon maturation test" inkubasi pada 37°-38° C selama 24 jam jika sebagian besar berbentuk cincin besar atau medium, atau selama 26 jam jika sebagian besar berbentuk cincin kecil (Tan -ariya, 1993). Metoda "schizont maturation test" didasarkan bahwa bentuk cincin (trofosoit muda) setelah 24-26 jam akan berubah menjadi preskizon dan skizon. Evaluasi dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam (Rieckman dkk, 1978).

Untuk "growth inhibition test", evaluasi dilakukan setelah 48 jam tanpa penggantian medium, tetapi setelah 24 jam dilakukan penggantian fase gas dalam "candle jar". (Trager, 1979).

2.8.2.2. Evaluasi hasil pengujian efek antimalaria

Setelah inkubasi selama 24 atau 48 jam, lempeng sumur mikro dikeluarkan, suspensi bagian atas yang jernih dibuang, suspensi yang pekat dibuat sediaan lapisan darah tebal, dan untuk setiap obat dibuat 3 seri sediaan. Sediaan dikeringkan pada suhu kamar selama 2-3 hari atau dalam inkubator 38° C selama 2 jam. Kemudian diwarnai dengan larutan Giemsa 2% dalam dapar (buffer) pH 6,6-6,8 atau Giemsa 1% dalam pH 7,2 selama 30 menit. (Pada pH6,6-6,8 kromatin merah terang, sitoplasma biru pucat). Evaluasi dilakukan dengan menghitung jumlah preskizon minimal mempunyai 3 inti yang hidup terhadap 200 parasit aseksual, kemudian dihitung prosen penghambatan terhadap kontrol tanpa pemberian obat. Test memenuhi syarat bila pada kontrol negatif terdapat minimal 20 skizon setiap 200 parasit aseksual.

Jumlah skizon yang hidup dibandingkan dengan kontrol dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$a = \frac{z \times 100}{c}$$

Keterangan :

a = % skizon dan preskizon dibandingkan dengan kontrol.

z = jumlah skizon dan preskizon setiap 200 parasit aseksual dalam satu sumur.

c = jumlah skizon dan preskizon setiap 200 parasit aseksual dalam kontrol .

Penghambatan juga dapat dihitung dengan tehnik "microdillution". Pada prinsipnya adalah sebagai berikut:

Parasit diinkubasi dengan obat selama 24 jam, sebelum ditambahkan [G^{-3} H] hipoksantin($0,02 \mu$ Ci setiap sumur mikro). Kemudian diinkubasi lagi selama 18-24 jam, dan parasit kemudian dipanen dengan menggunakan pemanen sel semiotomatik. Inkorporasi dari radiolabel ditentukan dengan metoda scintilisasi. (Kirby dkk, 1995; Wright dkk, 1996).

2.8.2.3. Analisis data

Dari data pengamatan dapat diperoleh data dalam bentuk prosen penghambatan. Untuk analisis data prosen penghambatan digunakan **Analisis varian (ANOVA)** model Rancangan tersarang, dimana sebelumnya data tersebut telah ditransformasikan ke dalam bentuk Log.Y. Jika dari data itu ada harga prosen penghambatan yang kurang dari 10% maka seluruh data ditransformasikan ke dalam bentuk $(Y+1)$. (Steel, 1980)..

Langkah-langkah pengolahan data statistik . (Usman, 1995).

1) Menyatakan H_0 (hipotesis nol) dan H_a (hipotesis alternatif), misalnya:

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

H_a = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh ekstrak terhadap pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

2) Mencari harga F hitung dengan tabel ANOVA. (Analisa varian).

F hitung yang diperoleh dibandingkan dengan F tabel .

Cara menarik kesimpulan :

F hitung \leq F tabel berarti : H_0 diterima dan H_a ditolak

F hitung \geq F tabel berarti: H_0 ditolak dan H_a diterima.

Menghitung IC_{50}

Yaitu kadar dimana prosen penghambatan pertumbuhan skizon sebesar 50%.

Untuk menentukan nilai IC_{50} digunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (probability unit) prosen penghambatan dengan logaritma kadar menggunakan persamaan garis regresi linier. (Mursyidi, 1985; Katsimananga, 1991; Okpako, 1991).

Persamaan regresi linier : $Y = a + bx$.

Dimana :

$$a = \frac{(\sum Y_i (\sum X_i)^2 - (\sum X_i) (\sum X_i Y_i))}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$b = \frac{n \sum X_i Y_i - (\sum X_i) (\sum Y_i)}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2}$$

Efektivitas prosen penghambatan.

Untuk mengetahui efektivitas prosen penghambatan dari setiap kelompok dilakukan uji LSD (Least Significant Difference) = BNJ (Beda Nyata Jujur).

$$LSD = t(\alpha / 2); (N-1) \sqrt{2 \text{MSE} / S}$$

Jika selisih harga rata-rata > LSD maka ada perbedaan yang signifikan dan sebaliknya.

Catatan :

Jika tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap kontrol positif, berarti mempunyai daya hambat seperti kontrol positif. Kontrol positif harus mempunyai selisih harga rata-rata dengan kontrol negatif yang lebih besar dari LSD (mempunyai perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif).