

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian yang digunakan.

Daun *E. triplinerve* dikeringkan dan dibuat serbuk, kemudian diperiksa senyawa kimianya dengan metoda penapisan fitokimia

Selanjutnya penelitian dilakukan dalam 3 tahap sebagai berikut:

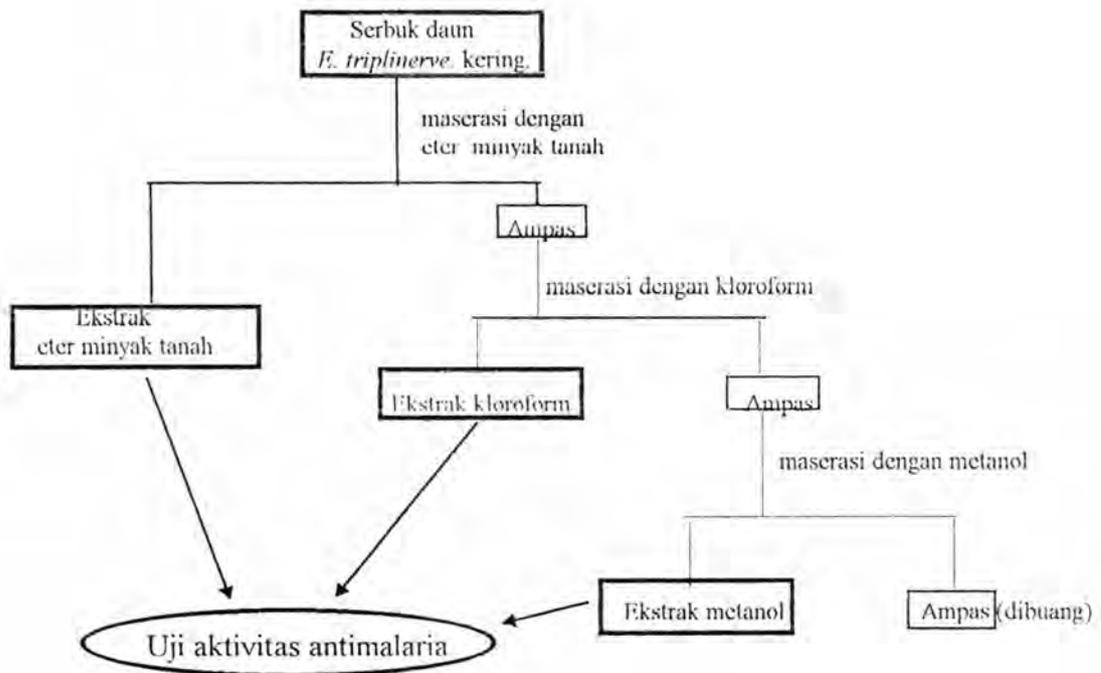
Tahap I : Serbuk daun *E. triplinerve* dimaserasi secara sinambung, mula-mula dengan eter minyak tanah, kemudian kloroform dan akhirnya metanol. Masing-masing ekstrak dikisatkan dengan putaran hampa, kemudian masing-masing ekstrak diperiksa aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

Tahap II : Terhadap ekstrak yang potensial dilakukan pemisahan secara kromatografi kolom (KK) dan dilakukan pengelompokan hasil pemisahan dengan bantuan kromatografi lapis tipis (KLT) , kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi atau dengan kromatografi cair tekanan medium (MPLC), maka diperoleh beberapa isolat . Terhadap isolat yang diperoleh dilakukan uji aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

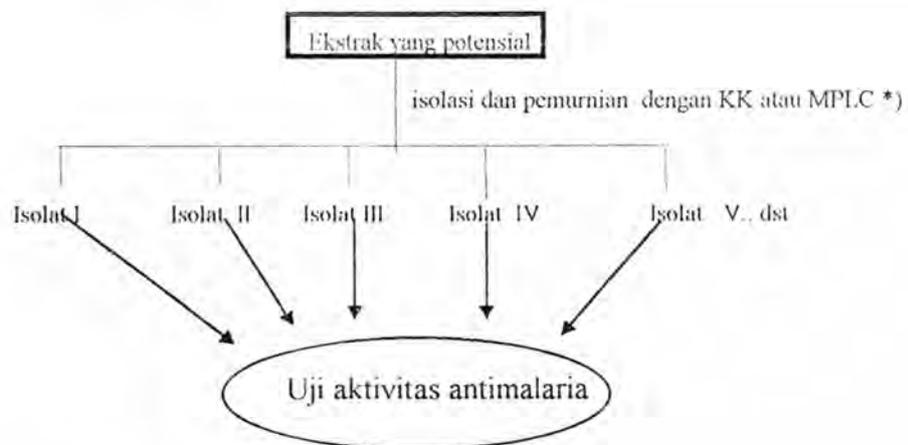
Tahap III : Terhadap isolat yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro* dilakukan pemeriksaan pemurniannya dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Struktur kimia senyawa tunggal ditentukan dengan bantuan spektroskopi ultra violet, spektroskopi inframerah, spektroskopi massa dan spektroskopi resonansi magnet inti.

Bagan rancangan penelitian dapat dibagi menjadi 3 tahap, sebagai berikut :

Bagan rancangan penelitian :

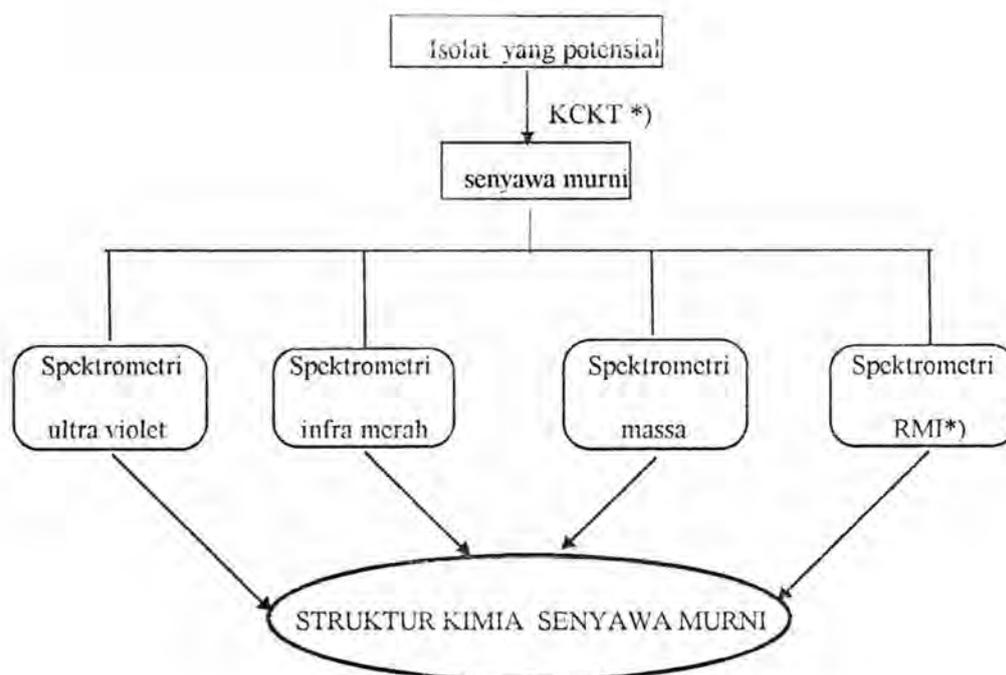
Bagan rancangan penelitian :

Gambar : 4.1 Bagan Penelitian Tahap I.



Gambar : 4.2 Bagan Penelitian tahap II

Keterangan *): KK = Kromatografi Kolom ; MPLC : Middle Pressure Liquid Chromatography



Gambar : 4.3 Bagan Penelitian Tahap III

4.2. Populasi, sampel, dan besar sampel (*sample size*)

Populasi yang diambil adalah daun prasman (*E.triplinerve*).

Sampel daun *E.triplinerve* diperoleh dari BALITTRO Bogor pada ketinggian ± 240 m di atas permukaan air laut, pada bulan Mei 1991 dan 1993. Teknik pengambilan dilakukan secara acak. Daun setelah dikeringkan sesuai dengan persyaratan, kemudian dibuat serbuk akhirnya dibuat ekstrak dalam eter minyak tanah, kloroform dan metanol.

Organisme untuk percobaan adalah *P.falciparum* galur I 2300 yang sensitif terhadap klorokuin diperoleh dari US NAMRU-2 Jakarta dan telah dibiakkan di PUSLITBANGKES DEP.KES RI.

Untuk masing-masing percobaan dilakukan dalam 3 replikasi

4.3. Variabel penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel

Pada pembuatan berbagai macam ekstrak daun prasman sebagai variabel utama adalah daun prasman, variabel bebas adalah pelarut, variabel tergantung adalah ekstrak.

Pada uji aktivitas penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* in vitro dari ekstrak, variabel utama adalah *P. falciparum*, variabel bebas adalah ekstrak dan variabel tergantung adalah aktivitas penghambatan (harga IC₅₀).

Pada pemisahan dan pemurnian senyawa isolat, variabel utama adalah ekstrak yang potensial, variabel bebas adalah metoda pemisahan dan pemurnian (KLT, KK, rekristalisasi, MPLC, KCKT), variabel tergantung adalah isolat.

Pada uji aktivitas penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* in vitro dari isolat, variabel utama adalah *P. falciparum*, variabel bebas adalah isolat dan variabel tergantung adalah aktivitas penghambatan (harga IC₅₀).

Pada penentuan struktur senyawa murni, variabel utama adalah senyawa murni, variabel bebas adalah metoda spektroskopi (ultra violet, infra merah, massa dan RMI), variabel tergantung adalah struktur senyawa murni

4.3.2. Definisi operasional variabel

Sampel adalah serbuk daun *E. triplinerve*.

Uji antimalaria adalah uji efek penghambatan ekstrak eter minyak tanah, kloroform dan metanol dari daun *E. triplinerve*, isolat dan klorokuin terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

Harga IC_{50} adalah kadar macam-macam ekstrak maupun isolat daun *E.triplinerve* yang menghambat pertumbuhan *P. falciparum in vitro* sebanyak 50% dibandingkan dengan kontrol.

Ekstrak eter minyak tanah dari daun *E.triplinerve* adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun *E.triplinerve* dengan eter minyak tanah, kemudian dikisatkan.

Ekstrak kloroform adalah hasil maserasi dengan kloroform dari ampas ekstrak eter minyak tanah, kemudian dikisatkan.

Ekstrak metanol adalah hasil maserasi dengan metanol dari ampas ekstrak kloroform, kemudian dikisatkan.

Isolat adalah senyawa yang diperoleh dari isolasi dan pemurnian ekstrak daun *E.triplinerve* yang bersifat menghambat pertumbuhan *P.falciparum in vitro*.

P.falciparum yang digunakan adalah *P.falciparum* yang sensitif terhadap klorokuin diperoleh dari US NAMRU-2 dan telah dibiakkan di Laboratorium Parasitologi kelompok Penelitian Penyakit Menular Bersumber Binatang PUSLITBANGKES DEP.KES.R.I, Jakarta.

4.4. Bahan atau materi penelitian

4.4.1. Bahan tumbuhan

Bahan tumbuhan *E.triplinerve* diambil dari tempat tertentu dan dideterminasi berdasarkan pustaka (Van Steenis, 1951). Determinasi juga dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI Balai Penelitian dan Pengembangan Botani Herbarium Bogoriense Bogor.

4.4.2. Organisme Uji

Sebagai organisme uji adalah *P.falciparum* galur I.2300 dari Irian Jaya yang sensitif terhadap klorokuin yang diperoleh dari US-NAMRU 2 di Jakarta dan telah dibiakkan di laboratorium Parasitologi Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (PUSLITBANGKES) Bagian Penyakit Menular Bersumber Binatang, Departemen Kesehatan R.I. di Jakarta.

4.4.3. Bahan kimia

Kecuali dinyatakan lain, bahan kimia yang digunakan adalah produksi E.Merek dengan derajat murni pereaksi ("pro analisa"). Daftar bahan kimia yang digunakan tertera pada Lampiran : 3 .

Untuk mengetahui sensitivitas *P.falciparum* terhadap klorokuin digunakan klorokuin difosfat yang diperoleh dari P.T.INDOFARMA Jakarta.

4.4.4. Media biak

Media biak ialah RPMI-1640 (RPMI = Rosewell Parla Memorial Institute) ditambah Natrium bikarbonat dan dapar (buffer) HEPES (HEPES = N-2-Hidroksi Ethyl Piperazin-N-2-Ethane Sulfonic Acid). Komposisi media biak tertera pada Lampiran :4.

4.5. Alat -alat dan instrumen penelitian

4.5.1. Alat untuk pembuatan ekstrak tumbuhan

Alat-alat yang digunakan terdiri dari:

Mesin penggiling merek : Retsch Muhle , Ayakan serbuk (4/18), Perangkat ekstraksi

4.5.2. Alat untuk isolasi dan pemurnian senyawa kandungan tumbuhan

Alat-alat untuk isolasi dan pemurnian senyawa aktif ialah :

Penguap putar vakum (Rotavapor) : Rotavapor Buchi R-114

Kolom untuk kromatografi

Bejana kromatografi

Penotol mikropipet.

Alat pengering. Alat pengering "lyophyllized," alat pengering dengan nitrogen cair.

Alat KCKT : HPLC Hewlett Packard series 1050.

Alat MPLC (Middle Pressure Liquid Chromatography) terdiri atas :

- Pompa : Büchi 681 Chromatography pump.
- Kolom : Büchi, bahan borosilikat 3.3 Code No. 28147 isi : Lichroptep RP. 18.
- Monitor panjang gelombang : Knauer wavelength monitor
- Kolektor fraksi : Fraction collector Buchi 684

4.5.3. Alat untuk identifikasi dan elusidasi struktur

Perangkat alat Kromatografi Lapis Tipis dengan lempeng : silika Gel Gf254, silika Gel 60F 254 Merck, Lempeng Diol F 254 S Merck, Lempeng RP.WF 254 S Merck,.

Bejana kromatografi, penotol mikropipet, alat penyemprot pereaksi, alat pengering.

Perangkat spektrofotometri ultra violet : Shimadzu UV-160

Perangkat Spektrofotometri Infra merah : Shimadzu IR-408

Perangkat Spektrometri massa : GC-IRD-MS HP (Hewlett Packard) .

GC seri 5890 series II plus (= plus MS); IRD seri 5965 B; MS seri 5989 B, seperangkat komputer.

Perangkat alat resonansi magnet inti (RMI) ialah : NMR: Varian unity INOVA , 500 Mhz.

4.5.4. Alat untuk uji efek antimalaria in vitro

Alat-alat untuk uji efek antimalaria in vitro tertera pada Lampiran : 5.

4.6. Lokasi dan waktu penelitian

Lokasi penanaman tumbuhan *E.triplinerve* di BALITTRO Bogor , dipanen pada bulan Mei 1993.

Pembuatan sediaan dari tumbuhan dan isolasi , dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Airlangga Surabaya dan laboratorium Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta. (tahun 1993-1997).

Isolasi , pemurnian dan pengukuran dengan spektrometer magnet inti di laboratorium Fitokimia dan Farmakognosi IPP Universite de Lausanne Switzerland. (bulan Mei 1997 - Juli 1997).

Pengukuran spektrometri massa di Laboratorium PUSLABFOR POLRI Jakarta. Bulan Januari 1997 dan Juli 1997).

Pembiakan *P. falciparum* dan uji efek antimalaria in vitro dilakukan di Laboratorium Parasitologi US NAMRU-2 Jakarta, Laboratorium Parasitologi BALITBANGKES di Jakarta dan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta. (Bulan Maret 1996 , Bulan Juli 1997 - Desember 1997).

Pengukuran spektrum ultra violet dan infra merah dilakukan di Laboratorium Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta bulan Desember 1997.

4.7. Prosedur pengambilan dan pengumpulan data

4.7.1 Penyediaan bahan tumbuhan

4.7.1.1. Pengumpulan bahan tumbuhan

Bahan untuk penelitian adalah daun *E. triplinerve* diperoleh dari BALITTRO Bogor pada ketinggian ± 240 m di atas permukaan laut.

Tumbuhan asal dideterminasi berdasarkan pustaka kemudian untuk memastikannya dilakukan determinasi di Herbarium Bogoriense Bogor.

Daun diambil dari tumbuhan yang berumur kira-kira 12 bulan, diambil pucuknya sampai daun yang sudah tua (7 daun dari pucuk), kemudian dibersihkan dari tumbuhan lain dan kotoran lain, dicuci dan dikeringkan di udara terbuka tanpa sinar matahari langsung.

Bahan yang sudah kering dihaluskan dengan mesin penggiling dan diayak dengan pengayak serbuk (4/18). Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

4.7.1.2. Pemeriksaan pendahuluan terhadap bahan tumbuhan

4.7.1.2.1. Metoda organoleptik

Pemeriksaan organoleptik terhadap tumbuhan dilakukan dengan membandingkan dengan data pustaka untuk identifikasi bentuk , warna bau dan rasa dari tumbuhan, batang, daun , bunga dan buah.

4.7.1.2.2. Metoda histokimia

Dilakukan pemeriksaan mikroskopik terhadap irisan daun yang diamati dengan mikroskop untuk mempelajari fragmen pengenal yang merupakan ciri khas daun *E. triplinerve*, juga identifikasi kandungan kimia misalnya tanin, minyak atsiri.

4.7.1.2.3. Metoda fitokimia .

Dilakukan uji fitokimia pendahuluan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalamnya. Metoda berdasarkan atas sifat fisikokimia dari golongan senyawa tersebut (Ciulci, 1984). Serbuk simplisia disari dengan pelarut yang berbeda kepolarannya, mula-mula dengan pelarut non polar (eter minyak tanah) hasilnya adalah ekstrak eter minyak tanah, disebut sari I, ampas kemudian disari dengan penyari polar (metanol) hasilnya adalah ekstrak metanol, disebut sari II, akhirnya ampasnya disari dengan pelarut yang sangat polar (akua panas) hasilnya adalah ekstrak akua panas, disebut sari III.

Untuk selanjutnya terhadap masing-masing sari dilakukan identifikasi senyawa yang di kandunginya. Identifikasi terutama ditujukan terhadap senyawa yang berdasarkan kemotaksonomi mungkin terdapat di dalam *E. triplinerve* yang bersifat antimalaria, dan senyawa yang oleh peneliti lain sudah diketahui, yaitu: minyak atsiri, senyawa seskuiterpenlaktone, kumarin, flavonoid, dan alkaloid pirolisidina.

Dari sari I dilakukan identifikasi terhadap minyak atsiri, terpenoid, alkaloid, kumarin.

Dari sari II dilakukan identifikasi terhadap alkaloid, kumarin, flavonoid, terpenoid.

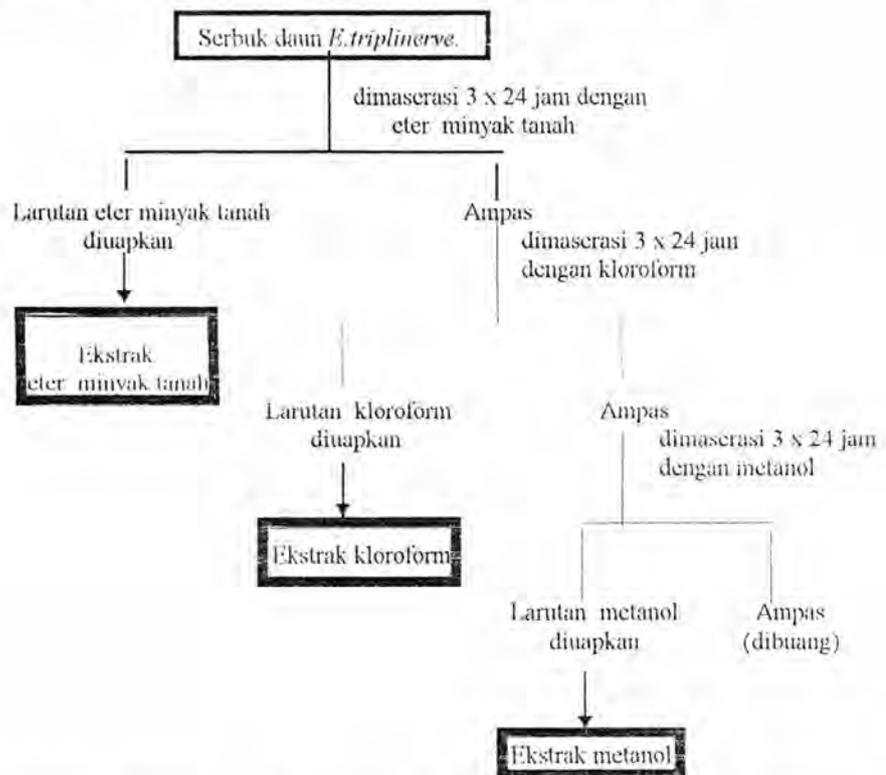
Dari sari III dilakukan identifikasi terhadap alkaloid

Proses identifikasi selengkapnya tertera pada lampiran : 6.

4.7.1.3. Pembuatan ekstrak tumbuhan .

Ekstrak dari tumbuhan dibuat dengan cara maserasi, yaitu merendam serbuk daun kering *E.triplinerve* dalam eter minyak tanah (t.d. 40° - 60 ° C) selama 24 jam. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali. Sari dalam eter minyak tanah dikumpulkan , diuapkan dengan penguap putar pada tekanan rendah sampai tidak dapat menguap lagi Hasilnya disebut ekstrak eter minyak tanah. Ampas sisa ekstraksi dikeringkan pada suhu kamar, kemudian dimaserasi dengan kloroform dengan cara sama pada pembuatan ekstrak eter minyak tanah. Hasilnya adalah ekstrak kloroform. Ampas dari ekstrak kloroform dikeringkan seperti di atas dan dimaserasi dengan metanol dengan cara sama dengan pembuatan ekstrak eter minyak tanah. Hasilnya adalah ekstrak metanol

Bagan proses pembuatan bermacam-macam ekstrak adalah sebagai berikut:



Gambar : 4.7 Bagan Proses Pembuatan bermacam-macam ekstrak daun *E.triplinerve*

4.7.2. Uji aktivitas antimalaria terhadap ekstrak tumbuhan

Uji aktivitas antimalaria terhadap ekstrak tumbuhan dilakukan dalam 3 tahap sesuai dengan rancangan penelitian. Semua pekerjaan uji aktivitas antimalaria dilakukan secara aseptik di dalam ruang steril ("Laminar air flow cabinet").

Langkah-langkah uji aktivitas antimalaria adalah sebagai berikut :

4.7.2.1. Biakan sinambung *P. falciparum*.

Untuk pembiakan sinambung *P. falciparum* dilakukan hal-hal sebagai berikut :

4.7.2.1.1. Sterilisasi alat-alat dan bahan kimia

Alat-alat dan bahan kimia (Lampiran : 4 dan 5) yang diperlukan disterilkan sesuai ketentuan dalam Farmakope Indonesia Ed. III (1979) dan Martindale Ed. XXX (1993).

4.7.2.1.2. Penyiapan pereaksi

Pereaksi yang diperlukan ialah : pewarna Giemsa, larutan dapar fosfat, larutan CPD :

Cara pembuatan tertera pada lampiran : 4.

4.7.2.1.3. Penyiapan medium biakan terdiri atas :

4.7.2.1.3.1. Medium dasar (RPMI 1640)

Buat larutan steril terdiri dari : 10,4 g RPMI 1640, 5,49 g HEPES, 3 g glukosa 40 g gentamisin dan akuabides sampai volume menjadi 1000 mL. Kemudian disaring melalui saringan milipor diameter 0,22 μ m, kemudian disimpan pada suhu 4° C.

4.7.2.1.3.2. Larutan sodium bikarbonat 5% w/v

Dibuat larutan sodium bikarbonat 5% w/v dalam akuabides, kemudian disaring melalui saringan milipor dengan diameter 0,22 μ m, dan disimpan pada suhu 4° C.

4.7.2.1.3.3. Medium lengkap (tanpa serum)

Medium RPMI sebanyak 100 mL dicampur dengan larutan sodium bikarbonat 5% w/v sebanyak 4,2 mL. Jika kadar CO₂ cukup, maka setelah 10-15 menit pH menjadi 7,3-7,4, warna kuning menjadi jingga.

4.7.2.1.3.4. Serum segar

Serum harus diambil dari darah segar melalui alat suntik steril dimasukkan kedalam tabung sentrifuga steril didiamkan pada suhu kamar atau 37° C selama 3 jam sehingga isinya membeku. Kemudian disentrifuga selama 8 -10 menit dengan putaran 1800 putaran/menit. Pindahkan ke dalam botol steril dan disimpan selama satu malam pada suhu 4° C. baru dapat digunakan. Kemudian disimpan pada suhu -20° C.

4.7.2.1.3.5. Medium biakan (RP-HS).

Medium lengkap sebanyak 104,2 mL dicampur dengan 11,5 mL serum homolog, kemudian disaring dengan milipor diameter 0,45 µm (supaya tidak tersumbat), baru disaring dengan milipor diameter 0,22 µm.

4.7.2.1.4. Penyiapan eritrosit

Sebanyak 10 mL darah yang telah disimpan pada 4° C dalam CPD atau ACD dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga bertutup dengan volume 40 mL., kemudian disentrifuga dengan putaran 1800 putaran / menit selama 8-10 menit pada suhu 4° - 20° C. kemudian plasma CPD dan "buffy coat" nya dibuang. "Packed cell" disuspensi kembali dengan 10 mL medium RPMI lengkap tanpa serum dan disentrifuga dengan putaran 1800 putaran / menit selama 10 menit pada suhu 4° - 20° C, lalu supernatan dibuang.

Pencucian tersebut di atas diulangi lagi, kemudian dicampur kembali dengan medium RPMI lengkap dengan serum volume sama.

Suspensi sel ini mengandung 5% eritrosit dan siap untuk dipakai pada sub-biakan, kemudian disimpan pada suhu 4° C.

Catatan : Eritrosit yang disimpan dalam CPD masih dapat digunakan selama 30 hari, tetapi darah yang disimpan sebagai "packed cell" (plasma dibuang) kurang tahan lama.

4.7.2.1.5. Penyiapan sel parasit

Sel parasit yang digunakan adalah galur I.2300 yang sensitif terhadap klorokuin., diambil dari simpanan beku.

Cara pencairan ("thawing") -

Biakan beku digosok-gosok dengan tangan atau dimasukkan ke dalam gelas berisi air, sehingga biakan menjadi cair, kemudian ditambahkan NaCl 3,5% sejumlah volume yang sama, dikocok sehingga terjadi hemolisis. Kemudian disentrifuga dengan putaran 1500 putaran/menit selama 7 menit pada suhu 4°-20° C, lalu supernatan dibuang. Proses pencucian di atas diulangi sekali lagi. "Packed cell" yang diperoleh (kira-kira 0,15 mL) disuspensi dengan serum RP-15 HS (15% serum manusia) sebanyak 0,5 mL, lalu disentrifuga dengan putaran 1500 putaran/menit, suhu 4°-20° C, dan supernatan dibuang. Pencucian diulangi lagi sebanyak dua kali. "Packed cell" disuspensikan kembali dengan RPHS dan ditambah 5-10 tetes larutan eritrosit sehingga diperoleh hematokrit 50% (Pavanand, 1974).

4.7.2.1.5.1. Menghitung parasitemia

Parasitemia ditentukan dengan cara menghitung jumlah parasit hidup terhadap 10.000 eritrosit.

4.7.2.1.5.2. Sub-biakan

Untuk sub biakan, parasitemia dibuat 0,1-0,5 % dengan cara menambahkan eritrosit yang baru dicuci.

Bagi-bagikan ke dalam cawan petri, yang berdiameter 35 mm diisi 1,5 mL, sedangkan yang berdiameter 60 mm diisi 4,0 mL. Diinkubasi dalam "candle jar" pada suhu 37° C.

4.7.2.1.5.3. Penggantian medium biakan

Medium biakan harus diganti setiap 24 jam dengan medium biakan segar yang baru dibuat. Pertumbuhan parasit dipantau untuk mengetahui lama siklus hidup parasit. Siklus hidup parasit yang telah lama dibiakkan biasanya kurang dari 48 jam. Siklus hidup *P. falciparum* selama 48 jam tertera pada lampiran : 7.

4.7.2.1.5.4. Sinkronisasi

Sinkronisasi dilakukan sebagai berikut :

Suspensi parasit dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga, disentrifuga dengan putaran 1800 putaran/menit selama 8-10 menit, suhu 4° -20° C, kemudian supernatan dibuang.

"Packed cell" disuspensikan dengan larutan 5% sorbitol dalam akuabides sebanyak 3-4 kali volumenya, kemudian didiamkan selama 30 menit atau dikocok perlahan-lahan selama 10 menit, lalu disentrifuga dengan 1800 putaran/menit suhu 4° -20° C selama 8-10 menit, kemudian sorbitol dicuci dengan medium biakan sebanyak 3-4 kali volumenya dan disentrifuga seperti di atas, supernatan dibuang. "Packed Cell" disuspensikan ke dalam

medium biakan sehingga diperoleh 5% suspensi.; bagi-bagikan ke dalam cawan petri dan diinkubasikan dalam “candle jar” dan inkubator 37° C seperti semula. Pertumbuhan parasit dipantau dengan pembuatan sediaan darah tipis dan tebal.

Pemberian sorbitol akan membunuh parasit yang berumur 18 jam atau lebih (bentuk cincin stadium lanjut). Sinkronisasi diulang kembali setelah 12 jam, sehingga diperoleh parasit yang berumur 12-18 jam. Untuk uji antimalaria digunakan parasit yang berumur kurang lebih 15 - 21 jam. Apabila kepadatan parasit rendah, sebelum sinkronisasi yang kedua kalinya, parasit dibiakkan selama satu siklus hidup; kemudian setelah 12 jam baru dilakukan sinkronisasi kedua kalinya. Agar dapat mengatur waktu melakukan uji efek antimalaria, maka setelah dibiakkan selama satu siklus hidup, disimpan beku untuk sewaktu-waktu dapat dipergunakan, setelah dilakukan sinkronisasi yang kedua kalinya.

4.7.2.2. Tehnik uji efek antimalaria

Untuk uji efek antimalaria yang digunakan ialah uji penghambatan pertumbuhan *P.falciparum* in vitro, dan yang dilakukan adalah “schizont maturation test” (Wernsdorfer, 1988).

Pada prinsipnya adalah sebagai berikut:

Ke dalam sumur mikro yang terdiri atas 96 sumur, 20 µL suspensi 10% eritrosit dengan parasitemia 1,0% dan DMSO (dimetilsulfoksida) 0,1% dimasukkan ke dalam setiap sumur yang telah berisi medium RPMI dengan 10% serum dan 0,1% DMSO (RPHS-DMSO) yang mengandung beberapa macam dosis obat yang diperiksa, sehingga volume menjadi 200 µL setiap sumur (Geary dkk, 1983). Dosis akhir dari obat setelah penambahan suspensi parasit adalah kadar obat (K)/ 200 µL.

Cara pengisian sumur mikro adalah sebagai berikut:

Secara aseptik dibuat larutan bermacam-macam ekstrak dalam RPHS-DMSO, kemudian disaring dengan saringan milipore diameter 0,45 μm , kemudian diencerkan dibuat bermacam-macam kadar sehingga kadar akhir dalam sumur mikro dalam volume 200 μL menjadi sebagai berikut : $K_1 = 10\,000\ \mu\text{g/mL}$, $K_2 = 1\,000\ \mu\text{g/mL}$, $K_3 = 100\ \mu\text{g/mL}$; $K_4 = 10\ \mu\text{g/mL}$; $K_5 = 1\ \mu\text{g/mL}$; $K_6 = 0,1\ \mu\text{g/mL}$.

180 μL macam-macam ekstrak dalam RPHS-DMSO dengan kadar berurutan diisikan ke dalam sumur. Juga dibuat kontrol sebagai berikut:

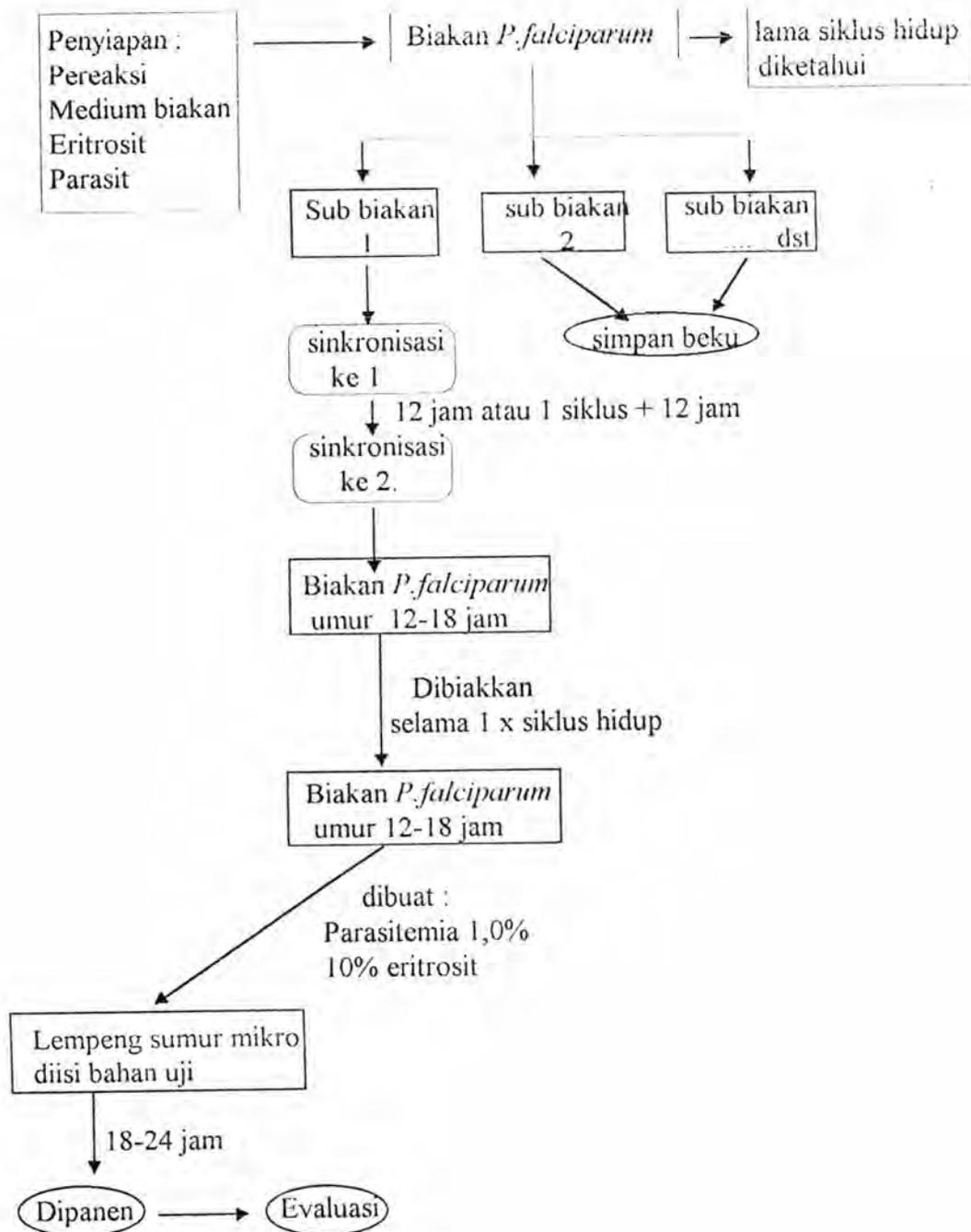
Kontrol (-1): 180 μL RPHS; Kontrol (-2) :180 μL RPHS-DMSO

Kontrol (+1): klorokuin difosfat ekuivalen dengan 16 pMol klorokuin / 180 μL RPHS.

Kontrol (+2): klorokuin difosfat ekuivalen dengan 16 pMol klorokuin / 180 μL RPHS-DMSO.

Kemudian semua sumur yang telah terisi obat ditambah 20 μL suspensi parasit dengan 10% eritrosit dan parasitemia 1,0%. Masing-masing bahan dibuat 3 kali ulangan. Lempeng sumur mikro kemudian dimasukkan ke dalam "candle jar" dan diinkubasikan selama 18-24 jam tergantung umur parasit pada awal inkubasi. Lama inkubasi diperhitungkan sedemikian rupa sehingga pada waktu panen belum ada skizon yang pecah.

Bagan langkah-langkah uji efek antimalaria adalah sebagai berikut :



Gambar : 4.9 : Bagan Langkah-langkah uji efek antimalaria :

4.7.2.3. Evaluasi hasil pengujian efek antimalaria.

Setelah diinkubasi selama 18- 24 jam sesuai dengan siklus hidup *P. falciparum* yang diteliti, dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tebal. Kemudian dihitung jumlah skizon hidup yang mempunyai 3 inti atau lebih, setiap 200 plasmodium dan dihitung prosen penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* terhadap kontrol negatif.

Kemudian dihitung IC_{50} dari masing-masing ekstrak.

4.7.2.4. Analisis data .

Dari data prosen penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro, dapat dihitung :

1. IC_{50} masing-masing ekstrak dengan analisis probit
2. Adanya perbedaan pengaruh secara bermakna dari masing-masing ekstrak dan masing-masing kadar dari ekstrak dengan menggunakan analisis varian (ANOVA).
3. Efektivitas prosen penghambatan dari setiap kelompok dosis ekstrak dengan perhitungan Least Significant Difference (LSD) = Beda Nyata Jujur (BNJ).

4.7.3. Isolasi senyawa kandungan ekstrak yang aktif sebagai antimalaria

Terhadap ekstrak yang menunjukkan adanya efek antiplasmodium dilakukan isolasi senyawa yang dikandungnya. Pada uji pendahuluan terhadap kandungan kimia daun *E. triplinerve*, ternyata mengandung senyawa kumarin dan terpenoid yang diduga merupakan senyawa yang mempunyai efek antiplasmodium.

4.7.3.1. Isolasi dan pemurnian senyawa kandungan ekstrak

Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut :

4.7.3.1.1. Pemeriksaan pendahuluan ekstrak dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dimaksudkan untuk menentukan eluen yang paling cocok pada kromatografi kolom. Sebagai fase diam digunakan silika gel GF 254 dan sebagai fase gerak adalah campuran pelarut non polar dengan pelarut polar dengan berbagai macam perbandingan. Sebagai penampak bercak digunakan berbagai macam pereaksi yang sesuai dan dilihat di bawah sinar ultra violet

4.7.3.1.2. Pemisahan isolat dengan Kromatografi kolom (KK)

Dari hasil KLT dapat ditentukan eluen yang paling sesuai. Kolom yang digunakan ialah : Silika gel 60. Eluat ditampung masing-masing sebanyak 5 mL, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan KLT. Eluat yang menunjukkan bercak yang sama dikumpulkan, dikeringkan dengan tekanan rendah, maka diperoleh beberapa macam isolat.

4.7.3.1.3. Pemurnian isolat

Pemurnian isolat yang diperoleh dilakukan dengan cara rekristalisasi dengan beberapa macam pelarut atau dengan menggunakan Kromatografi Cair Tekanan Medium (MPLC = Middle Pressure Liquid Chromatography).

Sebelum MPLC dilakukan, dilakukan KLT untuk menentukan eluen yang cocok.

Fase diam yang digunakan adalah : Silika gel, Diol, RP-18., RP.WF dengan pengembang dengan polaritas bermacam-macam. Kemudian menggunakan KCKT untuk mengetahui kemurnian dan menentukan cairan pengembang yang akan digunakan.

Caranya adalah sebagai berikut: Ditimbang 1 mg isolat yang akan dimurnikan, kemudian dilarutkan ke dalam tabung pemeriksaan KCKT. Kemudian diprogram sampai diperoleh kromatogram dan spektrum UV dari senyawa yang terdapat di dalamnya. Dari

kromatogram tersebut dapat ditentukan senyawa utama yang akan dimurnikan dan ditentukan pula cairan pengembang yang akan digunakan pada MPLC. Kemurnian isolat yang diperoleh dapat diketahui dengan KCKT.

4.7.3.2. Uji aktivitas antimalaria terhadap isolat

Terhadap isolat yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antimalaria. Cara seperti pada pengujian antimalaria terhadap ekstrak, tetapi dosis yang digunakan dimulai dengan 100 µg/mL. Analisis data yang dilakukan terhadap isolat sama dengan yang dilakukan terhadap pengaruh bermacam-macam ekstrak *P. triplinerve* pada pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

4.7.4. Identifikasi dan penentuan struktur senyawa yang aktif menghambat pertumbuhan *P.falciparum* in vitro.

Terhadap isolat yang menunjukkan aktivitas menghambat pertumbuhan *P.falciparum* in vitro dilakukan beberapa uji untuk menentukan struktur molekul yaitu analisis dengan spektrofotometer ultra violet, infra merah, spektrofotometer resonansi magnet inti proton, spektrofotometer resonansi magnet inti karbon dan spektrometer massa.

4.7.4.1. Spektrum ultra violet

Spektrum ultraviolet (alat : Shimadzu UV- 160) dari senyawa dalam pelarut tertentu menunjukkan panjang gelombang serapan maksimum dan minimum dan kekuatan absorbansi pada maksimum dan minimum yang khas.

4.7.4.2. Spektrum infra merah

Spektrum infra merah (alat: Shimadzu IR-408) , menggunakan lempeng KBr, akan memberikan pita-pita serapan pada daerah bilangan gelombang tertentu, dari gugus fungsi

4.7.4.3. Spektrum resonansi magnet inti

Untuk mengetahui jumlah atom H, C dan posisinya serta korelasi antara H-H dan korelasi antara H-C dilakukan analisis dengan satu dan dua dimensi spektroskopi resonansi magnet inti (alat: Varian Unity Inova: 500 MHRz.) , Sebagai pelarut digunakan CDCl_3 atau DMSO-d_6 dengan TMS sebagai standar internal. Spektrometer resonansi magnet proton ($^1\text{H-RMI}$) dan spektrometer resonansi magnet inti karbon ($^{13}\text{C-RMI}$) akan memberikan sinyal-sinyal pada pergeseran kimia (δ) tertentu

4.7.4.4. Spektrum massa

Spektrum massa (alat: GC-IRD-MS HP: GC seri 5890; IRD seri 5965 B; MS seri 5989 B) memberikan sinyal yang menyatakan bobot molekul per muatan (m/z) atau massa per muatan (m/e) dari molekul dan pecahan molekul yang mengalami fragmentasi.