

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Determinasi tumbuhan

Tumbuhan yang diteliti, dinyatakan sebagai *Eupatorium triplinerve* Vahl, oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi-LIPI Balai Penelitian dan Pengembangan Botani Herbarium Bogoriense. (Lampiran 8.)

5.1.2 Hasil pemeriksaan pendahuluan tumbuhan

5.1.2.1. Hasil Pemeriksaan morfologi :

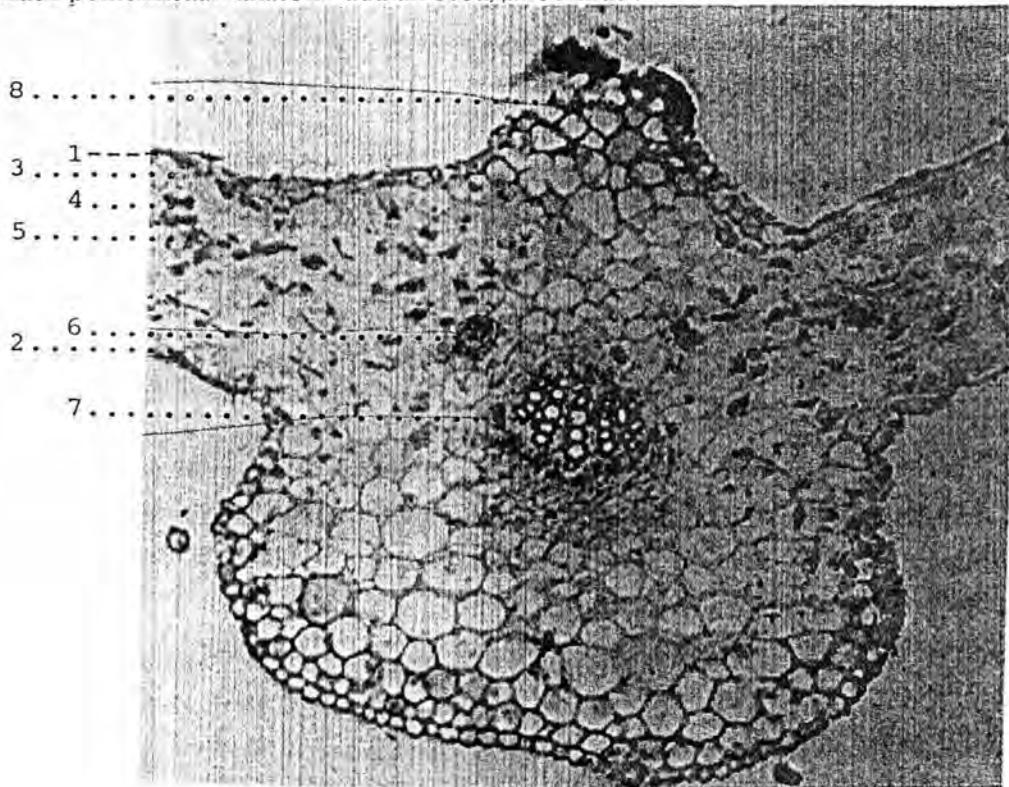
Hasil pemeriksaan morfologi dibandingkan dengan pustaka tertera pada Tabel : 5.1

Tabel : 5.1 Hasil Pemeriksaan morfologi tumbuhan.

Bagian tumbuhan	Pengamatan	Data Pustaka (Backer, 1963)
Tumbuhan	Semak, tinggi 30-100 cm	Semak, tinggi 50-100 cm
Batang	Berkayu, beruas-ruas warna merah muda	Berkayu, beruas-ruas warna merah muda
Daun	Tunggal, berhadapan, bentuk lanset, tepi rata atau bergerigi, ujung runcing agak melengkung ke bawah pangkal meruncing, permukaan licin dan mengkilat tulang daun menyirip, ukuran daun 3-9 cm x 1-2,5 cm warna hijau kekuningan, bau aromatik.	Tunggal, berhadapan, bentuk lanset, tepi rata atau bergerigi, ujung runcing agak melengkung ke bawah pangkal meruncing, permukaan licin - tulang daun menyirip, ukuran daun 5-8 cm x 1-2 cm, warna hijau kekuningan, bau aromatik.
Bunga	tidak ditemukan	
Buah	tidak ditemukan	

Hasil pemeriksaan anatomi.

Hasil pemeriksaan anatomi adalah sebagai berikut :



Gambar : 5.1 Irisan melintang daun *E.triplinerve* Vahl.

Pengamatan :

Epidermis (1): Epidermis atas terdiri dari 1 lapis sel berbentuk poligonal dan memanjang , pada epidermis terdapat stomata tipe anisositik (2), lebih banyak terdapat pada epidermis bawah.

Mesofil : Terdiri dari jaringan palisade (3) satu lapis dan jaringan bunga karang (4) beberapa lapis sel yang berisi butir-butir klorofil (5) dan tetes-tetes minyak (6). Pada ibu tulang daun terlihat berkas pengangkut tipe kolateral (7) dan terdapat jaringan kolenkhim (8) pada sudut bagian atas dan bagian bawah .

5.1.2.3. Hasil pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia

Pada pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia , ditemukan adanya ; minyak atsiri, terpenoid, tanin, kumarin, dan flavonoid.

5.1.3. Hasil pembuatan serbuk daun *E. triplinerve*.

Cabang berdaun *E. triplinerve* diterima dari BALITTRO Bogor tanggal 9 Mei 1993. Pucuk dengan daun sebanyak 7 helai dan semua daun di bawahnya diambil, dicuci dan diangin-anginkan sampai kering. Kemudian digiling dan diayak di Lembaga Treub Bogor dengan mesin penggiling merek Retsch Muhle dan ayakan serbuk (4/18).

5.1.4. Hasil ekstraksi serbuk daun *E. triplinerve*.

2,250 kg serbuk simplisia dimaserasi 3 kali dengan 8 L eter minyak tanah selama 3 hari. Setelah disaring, dikisatkan dengan penguap putar (rotavapor) suhu 40° tekanan 200 mBar, diperoleh ekstrak eter minyak tanah kental 92,1 g. Ampas dimaserasi dengan 8 L kloroform dengan cara seperti di atas, diperoleh ekstrak kloroform kental 52,849 g. Ampas dari ekstrak kloroform, dimaserasi dengan 8 L metanol dengan cara seperti di atas diperoleh ekstrak metanol kental 302,2 g

5.1.5. Hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap ekstrak

Sebelum dilakukan uji aktivitas antiplasmodium, dilakukan pembiakan *P. falciparum* untuk mengetahui siklus hidupnya.

Siklus hidup *P. falciparum* yang diteliti ternyata berlangsung antara 46-47 jam, dan semua Plasmodium dalam bentuk aseksual.

5.1.5.1. Pengamatan hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap ekstrak daun *E.triplinerve*

Untuk mengetahui aktivitas antiplasmodium dari masing-masing ekstrak , kontrol negatif dan kontrol positif, dilakukan penghitungan jumlah skizon hidup yang mempunyai minimal 3 inti dihitung terhadap 200 *P.falciparum* dalam setiap sumur mikro. Hasil pengamatan tertera pada Tabel : 5.2 dan Tabel:5.3.

Tabel 5.2.

Jumlah skizon hidup minimal 3 inti setiap 200 plasmodium dalam kontrol (-1), kontrol (-2), kontrol (+1) dan kontrol (+2)

Macam uji	Pengulangan	Jumlah skizon per 200 plasmodium
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
K(+1)	1	0
	2	0
	3	0
K(+2)	1	0
	2	0
	3	0

Keterangan :

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

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

K(+1) = kontrol positif 1 berisi klorokuin difosfat ekuivalen dengan 4 pMol /50µL darah medium tanpa DMSO.

K(+2) = kontrol positif 2 berisi klorokuin difosfat ekuivalen dengan 4 pMol/50 uL darah medium dengan penambahan 0,1% DMSO.

Tabel : 5.3

Jumlah skizon hidup minimal 3 inti setiap 200 *P. falciparum*. dalam sumur mikro berisi ekstrak daun *E. triplinerve*.

Ekstrak	Pengu-langan	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K(-2)
Eter minyak tanah	1	0	0	13	29	46	98	119
	2	0	0	18	43	54	96	114
	3	0	8	29	36	82	110	125
Kloro-form	1	0	9	68	85	106	101	119
	2	0	7	50	89	97	106	114
	3	0	16	42	80	102	110	125
Metanol	1	0	15	53	81	110	111	119
	2	0	16	65	86	109	110	114
	3	0	20	71	80	121	120	125

Keterangan :

K = kadar bahan uji

K(-2) = kontrol negatif dengan DMSO 0,1% tanpa pemberian bahan uji

K1 = 10.000 µg/mL K4 = 10 µg/mL

K2 = 1.000µg/mL K5 = 1 µg/mL

K3 = 100 µg/mL K6 = 0,1 µg/mL

5.1.5.2. Analisis data uji aktivitas antiplasmodium terhadap ekstrak daun *E. triplinerve*

Pada pengamatan terhadap kontrol negatif, ternyata penambahan 0,1% DMSO tidak mempengaruhi pertumbuhan *P.falciparum* in vitro (Perhitungan statistik pada Lampiran : 9)

Pada pengamatan terhadap kontrol positif, semua plasmodium mati. Ini berarti bahwa *P. falciparum* I.2300 sensitif terhadap klorokuin.

5.1.5.2.1. Menghitung IC₅₀

Dari data jumlah skizon hidup minimal 3 inti diperoleh data prosen penghambatan masing-masing ekstrak terhadap pertumbuhan *P. falciparum*. Dari data prosen penghambatan dapat dibuat kurva hubungan antara probit prosen penghambatan dengan log. kadar . Dari kurva tersebut dapat diperhitungkan IC₅₀, yaitu kadar dimana prosen penghambatan pertumbuhan skizon sebesar 50% .

Harga IC₅₀ dari bermacam-macam ekstrak ditemukan sebagai berikut (Lampiran 10):

Ekstrak dalam eter minyak tanah : IC₅₀ sebesar 2,25 µg/mL

Ekstrak dalam kloroform : IC₅₀ sebesar 14,78 µg/mL

Ekstrak dalam metanol : IC₅₀ sebesar 27,24 µg/mL

5.1.5.2.2. Analisis varian (ANOVA)

Dari uji ANOVA (Lampiran : 11) diperoleh kesimpulan bahwa :

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

Dari hasil tersebut di atas maka dapat diambil kesimpulan bahwa : ekstrak dalam eter minyak tanah dari daun *E. triplinerve* adalah paling potensial sebagai anti *P. falciparum* in vitro dibandingkan dengan ekstrak dalam kloroform dan ekstrak dalam metanol; dan yang paling kurang potensial adalah ekstrak dalam metanol.

5.1.6. Hasil isolasi senyawa kandungan ekstrak daun *E.triplinerve*.

Terhadap ekstrak eter minyak tanah dan ekstrak kloroform dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom, kemudian fraksi yang diperoleh dimurnikan dengan rekristalisasi atau dengan MPLC ("Middle Pressure Liquid Chromatography")

5.1.6.1. Isolasi dan pemurnian kandungan ekstrak eter minyak tanah :

Pemisahan dengan Kromatografi kolom (kondisi sebagai berikut: Fase diam : Si gel., Fase gerak : heksan / etil asetat = 4 : 1 gradien → etil asetat) diperoleh 2 isolat sebagai berikut:

Isolat I :

Isolat I dicuci dengan iMeOH berkali-kali, kemudian direkristalisasi dengan eter , diperoleh kristal bentuk jarum dan lempeng, warna putih (120 mgram)

Isolat II:

Isolat II dimurnikan dengan alat MPLC (Kolom : RP-18, eluen : MeOH / air = 33 : 67; 50 : 50). Diperoleh kristal bentuk lempeng, jernih, tak berwarna (90 mgram)

5.1.6.2. Isolasi dan pemurnian kandungan ekstrak kloroform:

Terhadap ekstrak kloroform dilakukan kromatografi kolom, mula-mula dengan kolom Aluminium oksida, pengembang kloroform/metanol= 7:3 gradien → metanol, kemudian terhadap fraksi yang diperoleh dilakukan pemurnian dengan MPLC (Kolom: RP-18, pengembang : MeOH / air = 28 : 72) diperoleh Isolat III bentuk hablur seperti sisik/ lempeng warna jernih agak kotor (60 mgram).

Terhadap ketiga isolat tersebut dilakukan Kromatografi Lempeng Tipis (KLT) diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel : 5. 10
Data KLT isolat ekstrak daun *E. triplinerve*. *)

Isolat	Bentuk isolat	Warna bercak	Rf
I	Habur bentuk jarum dan lempeng, warna putih	Kuning tua	0,20
II	Habur bentuk lempeng, jernih, tak berwarna	Fluresensi ungu	0,18
III	Habur bentuk lempeng atau sisik, jernih, agak coklat	Fluoresensi biru terang	0,12

*) Kondisi: Fase diam : Silica gel ; Fase gerak : heksan/etil asetat = 4:1,
Penampak bercak : anis aldehid asam sulfat. Deteksi : sinar uv 366 nm

5.1.7. Hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap isolat

Terhadap 3 isolat yang diperoleh dilakukan uji aktivitas anti *P. falciparum*, dengan cara sama seperti terhadap bermacam-macam ekstrak

5. 1.7.1. Pengamatan hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap isolat

Dengan cara seperti pada ekstrak diperoleh hasil prosen penghambatan bermacam-macam isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro seperti tertera pada Tabel : 5.11

Tabel : 5.11.

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

Isolat	Pengulangan	K 1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
I	1	5,5	13	13	12	4	0	-
	2	60	31	18	17	8	0	-
	3	50	18	8	4	5	0	-
	Rata2	55	22	13	11	5,6	0	-
	SD (\pm)	5,0	7,5	5,0	6,5	2,1		
II	1	-	100	98	78	58	44	27
	2	-	98	100	76	49	47	30
	3	-	100	100	78	67	31	42
	Rata2	-	99,3	99,3	77,3	58	40,6	33
	SD (\pm)		1,15	1,15	1,15	9,0	8,5	7,94
III	1	100	100	87	69	34	5	-
	2	100	100	88	65	36	11	-
	3	100	100	79	60	24	2	-
	Rata2	100	100	84,7	64,7	31,3	6	-
	SD (\pm)	0	0	4,9	4,5	6,43	4,6	

Keterangan :

K1 = 200 μ g/mL

K4 = 25 μ g/mL

K7 = 3,125 μ g/mL

K2 = 100 μ g/mL

K5 = 12,5 μ g/mL

K3 = 50 μ g/mL

K6 = 6,25 μ g/mL

5.1.7.2. Analisis data uji aktivitas antiplasmodium terhadap isolat

5.1.7.2.1. Perhitungan kriteria IC₅₀

Perhitungan IC₅₀ tertera pada Lamp. 12. dengan hasil sebagai berikut:

Isolat I : IC₅₀ = 139,78 μ g/mL.

Isolat II : IC₅₀ = 7,17 μ g/mL.

Isolat III : IC₅₀ = 18,82 μ g/mL.

5.1.7.2.2. Analisis varian (ANOVA).

Hasil analisis varian adalah sebagai berikut: (Lampiran : 13).

- 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

5.1.7.2.3. Perhitungan Beda Nyata Jujur (BNJ)

Hasil perhitungan Beda Nyata Jujur ialah : (Lampiran : 13).

Yang mempunyai efek relatif sama dengan kontrol positif yaitu yang mempunyai selisih harga yang lebih kecil daripada harga BNJ (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 $\geq 25 \mu\text{g/mL}$.

Jadi dapat diambil kesimpulan bahwa yang relatif potensial ialah : Isolat II dan isolat III, sedangkan isolat I tidak potensial sebagai penghambat pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

5.1.8. Hasil pengukuran spektroskopi senyawa aktif terhadap *P. falciparum* in vitro.

Terhadap kedua isolat yang potensial menghambat pertumbuhan *P. falciparum* in vitro dilakukan pengukuran kromatografi dan spektroskopi untuk mengetahui kemurnian dan strukturnya. Kromatografi dan spektroskopi yang dilakukan adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), spektroskopi ultra violet (UV), spektroskopi infra

merah (IR), spektroskopi Resonansi Magnet Inti (RMI) proton dan karbon, spektrometri massa (MS).

5.1.8.1. Hasil pengukuran KCKT. (Lampiran 14)

Hasil pengukuran KCKT isolat II dan isolat III tertera pada Tabel 5.17

Tabel : 5.17

Hasil kromatografi dengan KCKT dari isolat II dan isolat III

Isolat	Waktu retensi (RT) (menit)	Gambaran UV (λ max. ,nm).
II ^{*)}	8,55	217, 321.
II ^{**)}	16,53	217,321.
III ^{*)}	7,38	207; 230; 260; 295; 205
III ^{**)}	12,46	207; 230; 260; 295, 205

Keterangan:

Alat KCKT : HPLC Hewlett Packard series 1050

*) Kondisi : Kolom : RP-18; eluen : asetonitril, 16 menit

**) Kondisi : Kolom RP-18; eluen : metanol, 20 menit.

5.1.8.2. Hasil spektroskopi dari isolat II : (Lampiran: 15,16, 17, 18, 19)

5.1.8.2.1. Spektrum Ultra violet. (Alat : Shimadzu UV-160)

Hasil analisis dengan spektrofotometer Ultra violet menggunakan pelarut MeOH/H₂O diperoleh data serapan maksimum (λ max.) pada 216,8 dan 322 nm.

5.1.8.2.2. Spektrum Inframerah. (Alat : Shimadzu IR-408)

Analisis dengan spektrofotometer infra merah menggunakan lempeng KBr diperkirakan bahwa isolat III mempunyai gugus fungsi: lakton (serapan pada panjang gelombang 1710 cm⁻¹); senyawa α,β , karbonil tak jenuh (serapan pada panjang

gelombang 1610 cm^{-1}); inti benzena (aromatik) (serapan pada panjang gelombang $1500-1610 \text{ cm}^{-1}$); $-\text{CH}_3$; $=\text{CH}_2$; $\equiv\text{CH}$ (serapan pada panjang gelombang 1470 cm^{-1}); eter: $\equiv\text{C}-\text{O}-\text{C}\equiv$ (serapan pada panjang gelombang 1120 cm^{-1}) (Williams & Fleming, 1980).

5.1.8.2.3. Spektrum RMI proton dan karbon

Hasil analisis dengan RMI proton dan karbon , DEPT ^1H - ^1H cosy, ^1H - ^{13}C cosy, tertera pada Tabel: 5.18

Tabel : 5.18.
Hasil pengamatan spektrum ^1H -RMI (500 Mhz.dalam CDCl_3 , 26.0 C/ 299.1 K) dan spektrum ^{13}C -RMI (125 Mhz dalam CDCl_3 , 26.0 C/ 299.1 K) dari isolat II.

Nomor atom	Spektrum ^1H -RMI	Spektrum ^{13}C -RMI		^1H - ^1H cosy	^1H - ^{13}C cosy
	δ (ppm) *	δ (ppm)	DEPT**)		
2	-	162,8	C	-	-
3	6,213 (1H,d,J=9Hz)	112,9	CH	H-4	C-3
4	7,614 (1H,d,J=9 Hz)	143,4	CH	H-3	C-4
5	7,344 (1H,d,J=8,5 Hz)	128,7	CH	H-6	C-5
6	6,810 (1H,dd, J=8,5 Hz; 2,5 Hz)	112,5	CH	H-5, H-8	C-6
7	-	161,2	C	-	-
8	6,771 (1H,d,J=2 Hz)	100,8	CH	H-6	C-8
9	-	155,8	C	-	-
10	-	112,5	C	-	-
11	3,840 (3H,s)	55,68	CH_3	-	-

Keterangan :

*) δ = geseran kimia relatif terhadap TMS (tetrametilsilan)

**) DEPT = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

s = singlet ; d = doublet.

5.1.8.2.4. Spektrum massa

Analisis dengan menggunakan GCMS dibandingkan dengan senyawa dalam "Wiley library" diakses dari alat yang sama. Dari "Wiley library" senyawa dengan B.M. sama dengan isolat II dengan "quality" tertinggi (98) adalah senyawa 7- metoksi - 2H-1- benzopiran-2-on .

Perbandingan kedua spektrum massa tertera pada Tabel : 5.19 berikut

Tabel : 5.19
Spektrum massa dari isolat II dibandingkan dengan spektrum massa dari
7 metoksi -2H-1-benzopiran-2-on (= herniarin) (Wiley Library) *

Isolat II	Isolat II	Isolat II	7 metoksi – 2H-1- benzopiran- 2-on	7 metoksi – 2H-1- benzopiran- 2-on	7 metoksi – 2H-1- benzopiran- 2-on
m/z	ion positif	intensitas relatif	m/z	ion positif	intensitas relatif
176	M	100%	176	M	77,6%
149	(M-27)	8,96%	149	(M-27)	7,46%
148	(M - 28)	77,61%	148	(M - 28)	68,66%
133	(M- 43)	100%	133	(M- 43)	100%
105	(M- 71)	10,45%	105	(M- 71)	8,96%
89	(M - 87)	13,43%	89	(M - 87)	8,96%
77	(M - 99)	25,27%	77	(M - 99)	13,43%
63	(M - 113)	22,39%	63	(M - 113)	17,91%
51	(M - 125)	38,81%	51	(M - 125)	20,90%

Keterangan :

*) Wiley Library diakses dari alat GC-IRD-MS HP bersamaan dengan pengukuran GC- MS dari isolat II (Kondisi GCMS: Kolom : HP-5 (5% difenil, 95% dimetil polisiloksan); ukuran : 28.00 m x 0.250 mm; Helium 120 ° C; Tekanan: 10.8 p; Aliran : 1.00 mL/menit , Velocity: 38.7 cm/menit)

5.1.8.3. Hasil spektroskopi isolat III : (Lampiran : 15,17, 20, 21).

5.1.8.3.1. Spektrum Ultra violet (alat : Shimadzu UV-160)

Hasil analisis dengan spektrofotometer Ultra violet menggunakan pelarut MeOH diperoleh data serapan maksimum (λ max.) pada 207,2; 234,0; 294,0 dan 345,6 nm.

5.1.8.3.2. Spektrum Inframerah(alat : Shimadzu IR-408)

Analisis dengan spektrofotometer infra merah menggunakan lempeng KBr diperkirakan bahwa isolat II mempunyai gugus fungsi: lakton (-O-C=O) (serapan maksimum 1710 cm^{-1}); senyawa α,β , karbonil tak jenuh (serapan maksimum 1630 cm^{-1}) inti benzena (aromatik) (serapan maksimum $1500-1610\text{ cm}^{-1}$); $-\text{CH}_3$; $=\text{CH}_2$; $-\text{CH}$ (serapan maksimum 1470 cm^{-1}) (Williams & Fleming, 1980)

5.1.8.3.3. Spektrum RMI proton dan karbon

Hasil analisis dengan RMI proton dan karbon, DEPT, ^1H - ^1H cosy, ^1H - ^{13}C cosy, tertera pada Tabel 5.20.

Tabel : 5.20

Hasil pengamatan spektrum ^1H -RMI (500 Mhz,dalam DMS-d₆, 40.0 C/ 313.1 K) dan spektrum ^{13}C -RMI (125 Mhz DMSO-d₆, 40.0 C/ 313.1 K) dari isolat III.

	Spektrum ^1H -RMI	Spektrum ^{13}C -RMI	^1H - ^1H cosy	^1H - ^{13}C cosy
Nomor atom	δ (ppm) *)	δ (ppm)	DEPT**) C	-
2	-	160,13	CH	C-4
3	6,29 (1H,d,J=9,5 Hz)	112,5	CH	C-3
4	7,90 (1H,d,J=9,5 Hz)	144,23	CH	C-4
5	7,19 (1H,s)	105,3	CH	-
6	-	150,8	C	-
7	-	150,6	C	-
8	7,06 (1H,s)	97,8	CH	-
9	-	144,3	C	-
10	-	112,4	C	-
11	6,148 (2H,s)	102,3	CH ₂	

Keterangan :

*) δ = geseran kimia relatif terhadap TMS (tetrametilsilan)

**) DEPT = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

5.1.8.3.4. Spektrum massa

Analisis dengan menggunakan GCMS diperoleh hasil sebagai berikut.

m/z (% intensitas relatif) : 190 (100%); 162 (64,18%); 132 (1,49%); 106 (2,99%),
104 (7,46%); 76(23,88%); 69(10,45%); 53(17,91%); 51,23(885%).

(Kondisi GCMS; Kolom : HP-5 (5% difenil, 95% dimetilpolisilosan) ukuran :28.00 m x 0.250 mm.; Helium 120 ° C ; 10.8 psi ; Aliran : 1.00 mL/menit ; Velocity: 38.7 cm/menit.

Dari "Wiley library" senyawa dengan B.M. sama dengan isolat III hanya mempunyai "quality" tertinggi = 83.