

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1. Menentukan macam tumbuhan yang diteliti

Obat malaria baru dari tumbuhan yang sedang diteliti adalah artemisinin, senyawa seskuiterpenlakton, kandungan *Artemisia annua* L. yang sangat potensial sebagai obat antimalaria.

Pemilihan tumbuhan yang akan diteliti bertitik tolak pada senyawa seskuiterpenlakton yaitu artemisinin yang ditemukan dalam tumbuhan suku Asteraceae. Berdasarkan kemotaksonomi, tumbuhan lain dari suku Asteraceae mungkin mengandung senyawa seskuiterpenlakton dengan struktur dasar sama dengan artemisinin. Salah satu tumbuhan antimalaria di Indonesia yang memenuhi kriteria tersebut ialah *Eupatorium triplinerve* Vahl, dikenal sebagai daun prasman, berupa tumbuhan semak yang banyak tumbuh liar.

Dari penelitian yang terdahulu, dikatakan bahwa kandungan *E. triplinerve* antara lain: minyak atsiri, terpenoid, kumarin. Jika *E. triplinerve* mengandung terpenoid, kemungkinan struktur mirip artemisinin.

Selain seskuiterpenlakton (terpenoid), senyawa kumarin dari tumbuhan ternyata ada yang bersifat antimalaria, maka kumarin dari *E. triplinerve* mungkin juga bersifat antimalaria.

Dengan demikian maka jika *E. triplinerve* bersifat antimalaria, mungkin disebabkan oleh senyawa seskuiterpenlakton (golongan terpenoid) dan / atau kumarin.

6.2. Metodologi penelitian

Tumbuhan yang diteliti harus diyakini bahwa benar, yaitu dengan melakukan determinasi dan melakukan penelitian pendahuluan meliputi sifat morfologis, anatomis dan kandungan kimia yang dibandingkan dengan pustaka.

Determinasi terhadap tumbuhan yang diteliti tidak dapat dilakukan sendiri, karena data kurang lengkap dengan tidak dapat ditemukannya bunga dan buahnya. Hal itu sesuai dengan pernyataan Backer (1963) bahwa di Jawa jarang dapat ditemukan bunganya. Keadaan tersebut mungkin disebabkan karena *E. triplinerve* berkembang biak secara vegetatif dengan sirung panjang (virga) yang mempunyai akar. Pada sirung panjang tak pernah dihasilkan bunga, sehingga sering disebut cabang mandul. (Tjitrosoepomo, 1989). Determinasi dilakukan oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi-LIPI Balai Penelitian dan Pengembangan Botani Herbarium Bogoriense.

Dari telaah terhadap beberapa pustaka, ciri-ciri morfologis *E. triplinerve* hanya dapat disamakan dengan *E. ayapana* maka dapat disimpulkan bahwa sinonim dari *Eupatorium triplinerve* Vahl adalah *Eupatorium ayapana* Vent. Dengan demikian pustaka yang menyatakan bahwa sinonim dengan spesies lainnya, tidak dapat dibenarkan.

Hasil pemeriksaan anatomi dari daunnya ditemukan sel yang mengandung tetes minyak, menandakan bahwa daun mengandung minyak atsiri.

Hasil pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia, menyimpulkan bahwa daun

E. triplinerve yang diteliti mengandung : minyak atsiri, terpenoid, tanin, kumarin, flavonoid.

Dari hal-hal tersebut diatas dapat diyakini bahwa tumbuhan yang diteliti adalah

E. triplinerve Vahl sinonim dengan *E. ayapana* Vent

Selanjutnya penelitian dimulai dengan melihat aktivitas anti plasmodium dari bermacam-macam ekstrak daun *E. triplinerve* , dari ekstrak non polar (eter minyak tanah), semi polar (kloroform) dan polar (metanol). Dari ketiga ekstrak tersebut, terhadap yang potensial sebagai anti plasmodium dilakukan isolasi dan pemurnian zat yang dikandung. Selanjutnya terhadap senyawa hasil isolasi (isolat) dilakukan uji efek antiplasmodium, dan terhadap isolat yang aktif dilakukan penentuan struktur.

6.3. Hasil ekstraksi

Hasil proses maserasi 2,25 kg serbuk simplisia, diperoleh 92,1 g ekstrak eter minyak tanah, 52,849 g ekstrak kloroform dan 302,2 g ekstrak metanol.

Jadi 1 g ekstrak eter minyak tanah ekuivalen dengan 24,4 g simplisia, 1 g ekstrak kloroform ekuivalen dengan 42,7 g simplisia dan 1 g ekstrak metanol ekuivalen dengan 7,44 g simplisia.

6.4. Uji aktivitas antiplasmodium

Pembiakan plasmodium harus dilakukan di tempat steril dengan alat-alat yang steril, karena plasmodium sangat rentan terhadap bakteri maupun jamur.

Plasmodium yang digunakan ialah *P. falciparum* galur I. 2300 dari Irian yang sensitif terhadap klorokuin. Plasmodium diambil dari simpanan beku, setelah diencerkan (“thawing”) baru dapat dibiakkan. Pemiakan dilakukan beberapa kali siklus hidup sehingga diperoleh plasmodium yang cukup untuk sebagian disimpan beku (“cryopreserved”). Plasmodium yang disimpan beku, ternyata yang berumur lebih dari 18 jam sebagian besar mati, maka untuk penyimpanan beku lebih baik plasmodium bentuk cincin muda.

Sebelum digunakan untuk pengujian, harus diketahui terlebih dahulu siklus hidupnya. Siklus hidup sangat penting diketahui karena digunakan untuk menentukan waktu yang diperlukan bagi uji aktivitas anti plasmodium, untuk mencegah jangan sampai skizon pecah menjadi bentuk cincin. Ternyata plasmodium yang digunakan mempunyai siklus hidup antara 46- 47 jam.

Plasmodium yang digunakan harus sinkron, sedangkan plasmodium yang sudah dibiakkan lebih dari dua kali siklus hidup sering menjadi tidak sinkron lagi.

Sinkronisasi dilakukan dua kali dengan waktu antara 12 jam, sehingga diperoleh plasmodium dengan perbedaan umur 6 jam. Setelah sinkronisasi yang pertama kali, kemudian dibiakkan selama satu siklus hidup sehingga kepadatan parasit bertambah. Kemudian disimpan beku.

Apabila akan digunakan untuk uji antiplasmodium, dicairkan dan dibiakkan selama 12 jam, kemudian disinkronisasi yang kedua kalinya, akhirnya dibiakkan selama satu siklus hidup, baru dapat digunakan untuk uji.

Untuk pengujian aktivitas obat, biakan plasmodium dibuat parasitemia 1,0 % dengan 10% eritrosit. Pada kepadatan tersebut, penghitungan parasit cukup mudah dilakukan. DMSO (dimetilsulfoksida), adalah pelarut yang bersifat universal, ternyata pada kadar 0,1% tidak mempengaruhi pertumbuhan plasmodium.

Sebagai obat pembanding digunakan klorokuin difosfat yang bersifat skizontoside, jadi sesuai dengan uji yang dilakukan terhadap ekstrak dan isolat. Dosis klorokuin sesuai dengan ketentuan WHO yaitu : 4 pMol / 50 uL suspensi parasit.

Pada percobaan yang dilakukan, ternyata pada dosis tersebut semua plasmodium mati, maka *P. falciparum* galur I. 2300 sensitif terhadap klorokuin.

6.5. Hasil uji aktivitas anti *P. falciparum* in vitro terhadap ekstrak

Untuk mengetahui aktivitas penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* dari ketiga macam ekstrak *E. triplinerve* dilakukan pendekatan secara matematik dengan analisis probit (Okpako, 1991). Dari kadar ekstrak untuk uji anti *P. falciparum* sebesar : 0,10 µg/mL; 1,0 µg/mL; 10 µg/mL; 100 µg/mL ; 1000 µg/mL dan 10.000 µg/mL diperoleh hasil : bahwa ekstrak eter minyak tanah adalah yang paling potensial dengan IC₅₀ 2,25 µg/mL, kemudian ekstrak kloroform dengan IC₅₀ 14,78 µg/mL. dan yang paling kurang potensial adalah ekstrak metanol dengan IC₅₀ 27,24 µg/mL

6.6. Hasil isolasi senyawa kandungan ekstrak

Isolasi senyawa kandungan ekstrak dilakukan terhadap ekstrak eter minyak tanah

dan kloroform, dengan pertimbangan bahwa ekstraksi tidak dapat sempurna, maka masih ada senyawa yang belum terekstraksi oleh eter minyak tanah yang akan terekstraksi oleh kloroform. Dari ekstrak eter minyak tanah berhasil diisolasi dan dimurnikan 2 macam isolat yaitu : dari 90 gram ekstrak diperoleh 110 mg isolat I berupa hablur bentuk jarum dan lempeng, warna putih dan 90 mg isolat II berupa hablur bentuk lempeng dan jarum , jernih. Dari 50 gram ekstrak kloroform diisolasi dan dimurnikan 1 macam isolat (isolat III) sebanyak 60 mg berupa hablur bentuk lempeng , jernih, putih. Pemurnian isolat I dapat dilakukan dengan rekristalisasi, tetapi isolat II dan isolat III sukar dimurnikan dengan cara rekristalisasi. Pemurnian dilakukan dengan alat MPLC , macam eluen ditentukan dengan mencari campuran isokratik terlebih dahulu. Ternyata eluen yang cocok untuk pemurnian isolat II yaitu Metanol / air (33 / 67); sedangkan isolat III menggunakan eluen metanol/air (28/72).

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa isolat II dan isolat III bersifat semi polar, sehingga mungkin masih terdapat juga dalam ekstrak metanol. Hal ini yang menyebabkan ekstrak metanol masih menunjukkan aktivitas anti plasmodium.

6.7. Hasil uji aktivitas anti *P. falciparum* in vitro terhadap isolat

Dari perhitungan dengan pendekatan analisis probit, dari kadar isolat untuk uji aktivitas anti *P. falciparum* in vitro sebesar 3,125 µg/mL; 6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL ; dan 100 µg/mL memberikan hasil bahwa isolat I tidak potensial

dengan IC_{50} 135 $\mu\text{g/mL}$; sedangkan isolat II dan isolat III cukup potensial menghambat pertumbuhan *P. falciparum in vitro* dengan IC_{50} 7,17 $\mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} 18,82 $\mu\text{g/mL}$.

IC_{50} dari ekstrak lebih kecil daripada IC_{50} masing-masing isolat, hal ini disebabkan karena ekstrak mengandung beberapa senyawa diantaranya isolat II dan isolat III yang menghambat pertumbuhan *P. falciparum*. Maka ada kemungkinan bahwa penghambatan dari kedua isolat tersebut bersifat sinergistik.

6.8. Hasil penentuan struktur isolat yang aktif terhadap *P. falciparum*

6.8.1. Hasil penentuan struktur isolat II.

Dari hasil analisis dengan KCKT dengan eluen yang berlainan, pada waktu retensi tertentu selalu diperoleh puncak tunggal, dimana pada pengukuran dengan UV diperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang sama, maka kemungkinan bahwa isolat II dan isolat III berupa senyawa murni.

Hasil analisis dengan spektrum infra merah membuktikan adanya gugus fungsi benzena, lakton, senyawa α,β , karbonil tak jenuh $-\text{CH}_3$; $=\text{CH}_2$; $\equiv\text{CH}$ dan $\equiv\text{C}-\text{O}-\text{C}\equiv$.

Data KLT memberikan fluoresensi kuat, diduga berasal dari senyawa kumarin.

Hasil analisis dengan GCMS diketahui bahwa berat molekul isolat II sebesar 176 Dalton, dibandingkan dengan 7-metoksi-2H-1-benzopiran-2-on dari "Wiley library"

yang diakses dari alat yang sama menunjukkan “quality” 98 dan fragmentasi molekul keduanya identik.

Dari analisis tersebut diduga isolat II, kemungkinan senyawa 7-metoksi kumarin.

Analisis dengan RMI-proton, RMI-karbon dan DEPT, diketahui bahwa: jumlah atom C = 10, atom H = 8.

Inti kumarin mempunyai 2 atom O, jadi jumlah berat atom dari unsur yang diketahui = 160. Perbedaan berat atom berasal dari unsur yang belum diketahui = 16.

Dari data Silverstein (1981) berat atom / molekul yang mendekati 16 ialah : O (berat atom : 16), H₂N (berat molekul : 16,0187), dan CH₄ (berat molekul: 16,03130

Jadi rumus isolat II = adalah C₁₀H₈O₃.

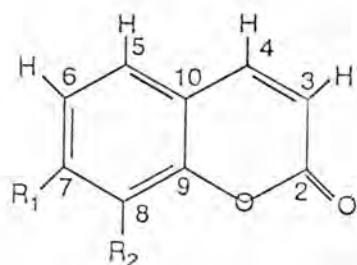
Analisis dengan RMI proton dan karbon dan DEPT diketahui bahwa terdapat atom H singlet pada geseran kimia 3,840 ppm, atom karbon dengan geseran kimia 55,68 ppm dari gugus CH₃.

Data spektroskopi dari isolat II dibandingkan dengan data dari kumarin, 7-hidroksi kumarin (Breit Maier & Voelter, 1978), 8-(2'-okso-2' metil) butoksi-7-metoksi kumarin (Rahman dkk, 1997) dan 7-metoksi kumarin (Shimomura, 1979) tertera pada Tabel : 6.1.

Tabel : 6.1

Data spektroskopi dari kumarin, 7-hidroksi kumarin (Breit Maier & Voelter, 1978), 8-(2'-okso-2' metil) butoksi-7-metoksi kumarin (Rahman dkk, 1997) dan 7-metoksi kumarin (Shimomura, 1979)

Spektroskopi	Isolat II	kumarin	7-hidroksi kumarin	8-(2'-okso-2' metil) butoksi-7-metoksi kumarin	7-metoksi kumarin
IR (ν , cm^{-1} , KBr)	1710,1610, 1500,1350, 1120.				1700,1620, 1500,1350, 1125
MS (m/z) (% intensitas relatif)	176 (100%) M^+				176 (M^+ , base peak)
^1H -RMI	(δ , ppm)				(δ , ppm)
H-3 :	6,213				6,24
H-4 :	7,614				7,60
H-5 :	7,34				7,32
H-6 :	6,81				6,80
H-8 :	6,77				
3H-11:	3,84				3.88
^{13}C -RMI	(δ , ppm)	(δ , ppm)	(δ , ppm)	(δ , ppm)	
C-2	162,8	159,2	161,0	164,3	
C-3	112,9	115,2	111,6	113,1	
C-4	143,4	142,5	144,5		
C-5	128,7	127,0	129,8		
C-6	112,5	123,2	113,4	114,6	
C-7	161,2	130,6	161,4	139,4	
C-8	100,8	115,1	102,5	155,4	
C-9	155,8	152,6	155,8	154,9	
C-10	112,5	112,6	111,6	110,3	
- O CH_3	55,68	-	-	56,1	



Gambar : 6.1. Inti kumarin

kumarin : $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{H}$

7-hidroksi kumarin : $\text{R}_1 = -\text{OH}$; $\text{R}_2 = -\text{H}$

7- metoksi kumarin : $\text{R}_1 = -\text{OCH}_3$; $\text{R}_2 = -\text{H}$

8-(2'-okso-2' metil) butoksi-7-metoksi kumarin

$\text{R}_1 = -\text{OCH}_3$;

$\text{R}_2 = -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_3$

CH_3

^{13}C -RMI isolat II dibandingkan dengan kumarin terdapat perbedaan pada geseran kimia pada C-6 dan C-7, disebabkan adanya substitusi

^{13}C -RMI isolat II dibandingkan dengan 7-hidroksi kumarin, kecuali geseran kimia atom C dari $-\text{OCH}_3$ keduanya identik.

^{13}C -RMI isolat II dibandingkan dengan 8-(2'-okso-2' metil) butoksi-7-metoksi kumarin terdapat kesamaan pada geseran kimia atom C dari $-\text{OCH}_3$.

^1H -RMI dari isolat II dibandingkan dengan 7-metoksi kumarin, keduanya identik, kecuali geseran kimia dari H-8 tidak dapat dibandingkan karena tidak disebutkan.

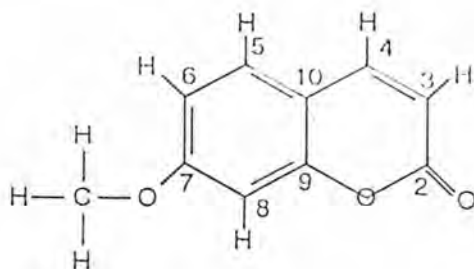
Spektrum IR dari isolat II dan 7-metoksi kumarin, keduanya identik

Dari data-data tersebut di atas, maka dapat disimpulkan bahwa isolat II adalah senyawa 7 metoksi kumarin.

Data ^1H - ^1H cosy dan ^1H - ^{13}C cosy dari isolat II memperkuat dugaan tersebut.

Data KLT yang menunjukkan fluoresensi kuat berwarna biru ungu dapat diperkirakan dari herniarin (= 7-metoksi kumarin) (Harborne, 1984).

Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat II adalah senyawa 7 metoksi kumarin dengan rumus pada gambar 6.2 berikut:



Gambar : 6.2

Rumus isolat II : $C_{10}H_8O_3$

=7- metoksi kumarin

= 7-metoksi-2H-1-benzopiran-2-on

= herniarin = ayapanin

6.3.2. Hasil penentuan struktur isolat III.

Seperti pada isolat II, hasil analisis dengan spektrum infra merah dan data KLT diduga isolat III berupa derivat kumarin.

Hasil analisis dengan GCMS diketahui bahwa berat molekul isolat III sebesar 190 Dalton.

Analisis dengan RMI-proton, RMI-karbon dan DEPT, diketahui bahwa: jumlah atom C =10 , atom H = 6.

Inti kumarin mempunyai 2 atom O, berat atom = 32. jadi jumlah berat atom dari unsur yang diketahui = 158. Perbedaan berat atom berasal dari unsur yang belum diketahui = 32

Dari data Silverstein (1981) berat atom / molekul yang mendekati 32 ialah : 2O (berat atom : 32), H_2NO (berat molekul : 32,0136), dan CH_4O (berat molekul: 32,0262) H_4N_2 (berat molekul 32,0375)

Jadi rumus isolat III = adalah $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_4$.

Analisis dengan RMI proton dan karbon dan DEPT diketahui bahwa terdapat atom H singlet pada geseran kimia 6,148 ppm, atom karbon dengan geseran kimia 102,3 ppm dari gugus CH_2 .

Dari penelusuran pustaka data spektrometri dari isolat III dibandingkan dengan dari 6,7-dioksi metilen kumarin (ayapin) (Varga dkk, 1983; Diem Trang dkk, 1992). tertera pada Tabel : 6.2.

Tabel : 6. 2.

Hasil spektroskopi isolat III dibandingkan dengan ayapin (6,7 dioksi metilen kumarin). (Varga, 1983; Diem Trang, 1992):

Spektroskopi	Isolat III	Ayapin (Varga, 1983)	Ayapin (Diem Trang, 1992)
UV (MeOH) (λ_{max} . nm)	345,6; 294,0; 234,0; 207,2.	348; 293; 234,; 254 (sh).	
IR (ν , cm^{-1}) (KBr)	3100; 2580; 1720 1710;1680; 1630;	3060;2920; 1710;1685; 1630;1580;	1720; 1610.
MS (m/z) (% intensitas relatif) :	190 (100%); (M) ⁺ 162 (64,18%); (M-28) ⁺ 132 (1,49%); (M-58) ⁺ 106 (2,99%); (M-84) ⁺ 104 (7,46%); (M-85) ⁺ 76 (23,88%); (M-114) ⁺ 51 (23,88%); (M-139) ⁺	190 (M+, 45); 162 (60); 134 (2); 132 (3); 117 (2); 104 (16); 95 (3).	
¹ H-RMI	(δ ; ppm)		
H-3	6,29	6,26	6,28
H-4	7,90	7,56	7,62
H-5	7,19	6,82	6,82
H-8	7,06	6,82	6,85
2H-11	6,148	6,06	
¹³ C-RMI .	(δ ; ppm)		
C-2	160,13		161,1
C-3	112,5		113,3
C-4	144,23		143,4
C-5	105,3		105,0
C-6	150,8		151,2
C-7	150,6		151,2
C-8	97,8		98,3
C-9	144,3		144,9
C-10	112,4		112,6
C-11 (-CH ₂)	102,3		102,3

Keterangan :

δ = geseran kimia relatif terhadap TMS (ppm) .

Data spektrum UV isolat III dan ayapin menunjukkan spektrum senyawa aromatis.

Data spektrum IR menunjukkan kesamaan gugus fungsi.

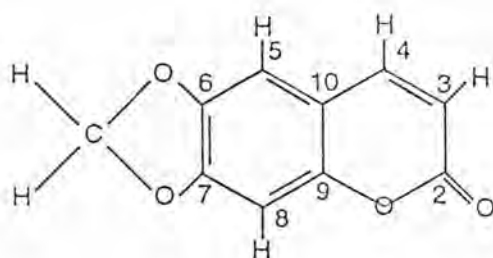
Data spektrum massa menunjukkan BM dengan fragmentasi identik.

Data spektrum ^1H -RMI dan ^{13}C -RMI isolat III dan ayapin baik hasil pengamatan

Varga maupun Diem Trang, keduanya identik. Maka dapat disimpulkan bahwa isolat III adalah senyawa ayapin = 6,7 dioksi metilen kumarin.

Data ^1H - ^1H cosy dan ^1H - ^{13}C cosy dari isolat III memperkuat dugaan tersebut.

Rumus isolat III tertera pada gambar 6.3 berikut



Gambar : 6.3

Rumus isolat III: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_4$

= 6,,7 -dioksi metilen kumarin

= 6,7, dioksi metilen -2H-1-benzopiran-2-on

= ayapin

Dari penelusuran pustaka, dikatakan bahwa senyawa utama dari *E. triplinerve* adalah ayapanin (herniarin, 7-metoksi kumarin) dan ayapin (6,7-dioksi metilen kumarin, disamping juga mengandung timohidrokuinin (Woerdenbag, 1993).

Maka dapat diyakini bahwa isolat II adalah senyawa 7-metoksi -2H-1-benzopiran-2-on = 7-metoksi kumarin = herniarin = ayapanin dan isolat III adalah 6,7-dioksimetilen - 2H-1-benzopiran-2-on = 6,7-dioksimetilen kumarin = ayapin.

6.9 . Daun prasman (*E. triplinerve*) sebagai obat malaria.

Dari penelitian yang telah dilakukan maka daun prasman yang secara tradisional digunakan sebagai obat malaria, ternyata memang dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* in vitro. Aktivitas tersebut disebabkan kandungannya, yaitu 7-metoksi kumarin atau herniarin atau ayapanin dan 6,7 metilen dioksi kumarin atau ayapin.

Telah diteliti bahwa beberapa senyawa kumarin dari tumbuhan yang menunjukkan aktivitas anti *Plasmodium falciparum* ialah: ostrutin, ostol , 5,6,7-metoksi kumarin, 4-fenil kumarin, dafnetin.

Mengingat hal tersebut maka ada kemungkinan senyawa kumarin dapat dikembangkan lebih lanjut untuk digunakan sebagai senyawa penuntun (“lead structure”) dengan melakukan modifikasi molekul untuk meningkatkan aktivitasnya sebagai anti *P.falciparum* .

Penggunaan daun prasman sebagai obat malaria secara tradisional diberikan dalam bentuk rebusan, maka di dalamnya akan terlarut beberapa macam senyawa termasuk

kedua macam kumarin tersebut yaitu 7-metoksi kumarin dan 6,7, dioksi-metilen kumarin. Dari percobaan di atas, ternyata IC_{50} dari ekstrak lebih kecil daripada IC_{50} masing-masing senyawa kumarin tersebut. Hal ini disebabkan karena ekstrak mengandung beberapa senyawa diantaranya kedua senyawa kumarin tersebut, yang menghambat pertumbuhan *P. falciparum*. Maka ada kemungkinan bahwa penghambatan terhadap pertumbuhan *P.falciparum* dari kedua senyawa kumarin tersebut bersifat sinergistik.

Disamping aktivitas sebagai anti *P.falciparum*, kumarin juga bersifat hepatotoksik, maka penggunaan daun prasman sebagai obat perlu diwaspadai. Maka perlu dilakukan penelitian toksisitas daun prasman, khususnya penelitian toksisitas dari kedua senyawa kumarin tersebut.