

2. ANTIMALARIALS.

3. PLASMODIUM FALCIPARUM

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ZAT KANDUNGAN DAUN PRASMAN (*EUPATORIUM TRIPLINERVE*. VAHL) YANG BERKHASIAH SEBAGAI ANTI *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN VITRO



KIK
Dis 14. 20/02
Sut.
i.



SITI MASROERAH BROTO SUTARYO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

1999

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI
ZAT KANDUNGAN DAUN PRASMAN
(*EUPATORIUM TRIPLINERVE*. VAHL)
YANG BERKHASIAH SEBAGAI
ANTI *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN VITRO**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam

Bidang Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Di bawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga

Prof. H. Soedarto, dr., DTM & H., Ph. D.

Telah dipertahankan di hadapan
Rapat Terbuka Senat Universitas Airlangga
Pada hari Selasa
Tanggal 20 April 1999
pukul 10.00 WIB



Oleh :

SITI MASROERAH BROTO SUTARYO

NIM : 099010873

Lembar Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui

tanggal : 18 Juli 1999

Oleh :

Promotor : **Prof. Dr. H. Sutarjadi, Apt.**

NIP : 130432617

Ko-promotor : **Prof. Dr. Sri Oemijati, dr. MPH TM.**

NIP : 130041687



.....
.....

Telah diuji pada Ujian Tertutup

Tanggal 16 Desember 1998

PANTIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Noorcholies Zaini, Apt.

Anggota : 1. Prof. Dr. Soedarman Brotosisworo, Apt.

2. Dr. H. Fasich, Apt.

3. Prof. Drs. Sumadi, Apt.

4. Prof. Dr. Sri Oemljati, dr. MPH. TM.

5. Prof. Dr. Sutarjadi, Apt.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor: 609/J03/PP/1999
Tanggal : 2 Januari 1999

“DAN TIDAKLAH ENGKAU DIBERI ILMU

KECUALI HANYA SEDIKIT”

(Q.S. Al Israa’ ayat 85)

UCAPAN TERIMAKASIH

Bismillah hirrochmannirrochim,

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang yang telah melimpahkan Rachmat dan Hidayah-Nya sehingga disertasi ini dapat kami selesaikan.

Penyusunan disertasi ini berdasarkan hasil penelitian tentang manfaat *Eupatorium triplinerve* Vahl. sebagai obat malaria, dengan harapan dapat merupakan sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya, dan khususnya di bidang penggunaan tumbuhan sebagai obat.

Pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada semua yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan disertasi ini, karena tanpa bantuannya penulis tidak dapat menyelesaikannya.

Ungkapan terimakasih penulis sampaikan kepada

Prof. H. Soedarto, dr. DTM&H, PhD. Rektor Universitas Airlangga dan Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr., mantan Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan program doktor di Universitas Airlangga, Surabaya.

Prof. Dr. H. Soedijono Tirtowidardjo, dr., Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Sutarjadi, Apt. mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan program doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Sutarjadi, Apt selaku Promotor yang telah memberikan bimbingan selama saya mengikuti program doktor sampai terselesaikannya penulisan disertasi.

Prof. Dr. Sri Oemijati dr, MPH TM, Konsultan WHO di PUSLITBANGKES DEPKES RI sebagai kopromotor saya yang telah memberikan bimbingan dalam menyelesaikan disertasi saya.

Jend. T.N.I Purn. Achmad Tahir, selaku Ketua Yayasan Pendidikan dan Pembina Universitas Pancasila Jakarta, Prof. Dr. Subroto, Rektor Universitas Pancasila, dan Prof. Dr. Awaloedin Djamin MPA, mantan Rektor Universitas Pancasila; M.Sumitro, drs.Apt., Dekan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, dan R.B.Sutrisno, drs Apt. mantan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila yang telah memberikan kesempatan dan bantuan biaya untuk melanjutkan pendidikan.

Prof. Dr. Pinardi Hadidjaja dr.MPH TM., Prof. Wita Pribadi dr., Inge Sutanto, dr. M.Phil, Rusli Mulyono dr.MSc. dan Rawina Winita Sutjahjono dra. MSc. atas fasilitas, bimbingan dan saran yang diberikan selama saya mengikuti latihan pembiakan *Plasmodium falciparum* di bagian Parasitologi FKUI Jakarta.

Prof. Dr. Sulaksono, Prof. Dr.J.R. Wattimena (alm.), Dr.Anna Setiadi Ranti, Apt. dan Dr. Maria Immaculata, Apt. M.Sc yang telah memberikan kesempatan, fasilitas, biaya dan bimbingan selama melakukan penelitian di PAU Ilmu Hayati ITB Bandung

Capt. H.V.Peterson, MSc, USN, Dr.Kurt Sorensen, Budi Leksono, drs. dan staf NAMRU -2 yang telah memberikan kesempatan, fasilitas dan bimbingan selama melakukan penelitian tumbuhan anti *P. falciparum* di NAMRU-2 Jakarta.

Brig. Jen. (Purn.) H.Untung Haryono, drs. dan Sri Pancawaty, dra. yang telah memberi kesempatan dan bimbingan teknik penggunaan alat GC-MS untuk penentuan struktur senyawa anti *P. falciparum* di PUSLABFOR MABES POLRI Jakarta.

Dr. Sumarjati Arjoso SKM, Kepala PUSLIT Penyakit Menular BALITBANGKES dan Dr. Suriadi Gunawan DPH, mantan Kepala PUSLIT Penyakit Menular BALITBANGKES; Harijani Marwoto, dra., Kepala kelompok Penelitian penyakit bersumber Binatang BALITBANGKES RI, Sekartuti Sulaksono, drg., Rita Supardiono, drh. yang telah memberikan fasilitas dan bimbingan teknik selama saya melakukan penelitian senyaw anti *P. falciparum* di laboratorium Parasitologi PUSLIT Penyakit Menular BALITBANGKES R.I. di Jakarta.

Prof. Dr.Kurt Hostettmann, Direktur Institut Pharmacognosie et Phytochimie (IPP) Universite de Lausanne, Switzerland, Dr.A.Marston , Prof. Dr.O.Potterat, Dr.J.L.Wolfender dan seluruh staf peneliti di IPP Lausanne yang telah memberikan kesempatan, fasilitas dan bimbingan selama saya melakukan isolasi, pemurnian dan penentuan struktur senyawa anti *P. falciparum* di IPP Lausanne, Swiss.

Prof. Sumadi, drs., Apt., Prof. Dr. Koesdianto Tantular, dr., Prof. D..Ma'rifin Husin, dr. M.Sc, Prof. Dr. Noor Cholies Zaini, Apt. dan Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan dr. M.Sc. atas saran-sarannya sebagai Panitia Penilai Usulan Penelitian.

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini, Apt., Prof..Dr. Yoes Prijatna Dachlan dr. M.Sc. Prof. Dr. Bambang Sukarjo, Apt. S.U; Prof. Dr. Soedarman .Brotosisworo Apt. dan Dr. H.Fasich .Apt. atas saran-sarannya sebagai Panitia Penilai Naskah Disertasi.

Prof. Dr.rer.nat. Gunawan Indrayanto, Apt., Dr..M.Zainuddin, Dr.Achmad Syahrani MS. serta semua staf pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan dan saran-saran dalam menyelesaikan disertasi saya.

Dr. Wahono Sumaryono, APU., Direktur Teknologi Farmasi dan Medika BPPT Jakarta dan Dr. Agus Supriyono, staf BPPT yang telah memberikan saran-saran dalam penyelesaian disertasi saya.

Ima Nurisa, drh. Msc. dari laboratorium Mammalogi PUSLIT Ekologi BALITBANGKES DEPKES RI yang telah memberikan bimbingan dan saran-saran dalam percobaan pembiakan *P. falciparum* di Fakultas Farmasi Universitas Pancasila

Prof. Sardjoko, drs.Apt., Hindra Rachmawati, Apt. MS., Ros Sumarny, Apt. MSc, A.Anton, Ir. Med., serta semua stak akademik dan non akademik di Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta yang telah memberikan saran-saran dan bantuan dalam menyelesaikan disertasi saya.

Akhirnya terimakasih yang tak terhingga kepada suami saya, H. Broto Sutaryo, dr. dan anak-anak kami yang telah dengan penuh keikhlasan memberikan dorongan selama saya menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi. Semoga Allah Yang Maha Kuasa memberikan balasan yang setimpal dan semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemanusiaan. Amin

RINGKASAN

Kata kunci : Daun prasman; *Eupatorium triplinerve* Vahl; Asteraceae; antimalaria; *Plasmodium falciparum*; 7 metoksi kumarin; 6,7- dioksi metilen kumarin.

Dalam dua dasawarsa terakhir, penyakit malaria kembali merupakan ancaman bagi kesehatan. Hal ini disebabkan karena resistensi vektor malaria, yaitu *Anopheles* sp. terhadap insektisida dan resistensi *Plasmodium falciparum* dan *P. vivax* terhadap obat malaria yang telah digunakan. Salah satu upaya untuk memeranginya ialah mencari obat baru dengan struktur penuntun berlainan dengan struktur penuntun obat malaria yang ada. Pencarian obat baru dapat dimulai dengan mencari senyawa aktif antimalaria dari tumbuhan yang secara tradisional digunakan sebagai obat malaria. *Eupatorium triplinerve* Vahl adalah salah satu tumbuhan yang di Indonesia telah digunakan sebagai obat malaria oleh masyarakat.

Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa kandungan *E. triplinerve* yang aktif sebagai antimalaria. Sebagai indikator antimalaria, adalah aktivitas penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* in vitro dari senyawa tersebut. Sebagai organisme coba digunakan *P. falciparum* galur I. 2300 yang sensitif terhadap klorokuin.

Percobaan dilakukan dalam lempeng sumur mikro dengan 96 lubang sumuran dengan dasar datar. Senyawa obat dilarutkan ke dalam media RPMI 1640 dengan 0,1% DMSO dalam satu seri terdiri dari 6 macam kadar. Medium biak yang mengandung senyawa obat dimasukkan ke dalam setiap sumur mikro, kemudian

diberi darah manusia dengan eritrosit 10% yang mengandung parasitemia 1%. Setelah diinkubasi dalam "candle jar" sesuai metode Trager dan Jensen, parasit dihitung dengan cara teknik pewarnaan dan penghitungan. Jumlah skizon yang hidup minimal mempunyai 3 inti dihitung terhadap 200 parasit aseksual digunakan sebagai kriteria efek antimalaria.

Hasil isolasi dan identifikasi senyawa kandungan *E. triplinerve* yang aktif menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* in vitro diperoleh dua senyawa. Senyawa pertama adalah 7-metoksi kumarin (= 7-metoksi 2-H-benzopiran-2 on =herniarin = ayapanin) dengan data spektrum sebagai berikut :

Spektrum ^1H -RMI (500 Mhz, dalam CDCl_3 , 26,0 C/299,1 K), ^{13}C -RMI (125 Mhz, dalam CDCl_3 , 26.0 C/299.1 K), ^1H - ^1H cosy, ^1H - ^{13}C cosy, dan pengamatan menggunakan DEPT menunjukkan adanya 9 puncak sinyal, yaitu : 5 sinyal dari gugus -CH- yaitu C-3 ($\delta= 112,9$ ppm), C-4 ($\delta= 143,4$ ppm), C-5 ($\delta= 128,7$ ppm), C-6 ($\delta= 112,5$ ppm), C-8 ($\delta= 100,8$ ppm), 1 gugus - CH_3 yaitu C-11 ($\delta= 55,68$ ppm), dan 3 atom C kwarterner yaitu: C-2 ($\delta= 162,8$ ppm), C-7 ($\delta= 161,2$ ppm), C-9 ($\delta= 155,8$ ppm), dan 1 atom C kwarterner berhimpit dengan C-6 yaitu : C-10 ($\delta= 112,5$ ppm). Juga menunjukkan sinyal proton dari H-3 ($\delta= 6,213$ ppm, d, J=9 Hz), H-4 ($\delta= 7,614$ ppm, d, J=9 Hz), H-5 ($\delta= 7,344$ ppm, d, J=8,5 Hz), H-6 ($\delta= 6,810$ ppm, dd, J=8,5; 2,5 Hz), H-8 ($\delta= 6,711$ ppm, d, J=2 Hz, dan 3 atom H pada H-11 ($\delta= 6,810$ ppm, s).

Spektrum massa (MS) menunjukkan berat molekul 176 Dalton dan spektrum IR ($\sqrt{\text{cm}}^{-1}$, KBr) menunjukkan adanya absorban maksimum pada 1710, 1610, 1500, 1470, 1350, dan 1120 cm^{-1} .

Senyawa kedua adalah 6,7 -dioksi metilen kumarin (= 6,7-dioksi metilen 2-H-benzopiran-2 on = ayapin) dengan data spektrum sebagai berikut:

Spektrum $^1\text{H-RMI}$ (500 Mhz, dalam DMSO-d_6 , 40,0 C/ 313,1 K), $^{13}\text{C-RMI}$ (125 Mhz. dalam DMSO-d_6 , 40,0 C/313,1 K), $^1\text{H-}^1\text{H}$ cosy, $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ cosy, dan pengamatan menggunakan DEPT menunjukkan adanya 10 puncak sinyal, yaitu : 4 sinyal dari gugus -CH- yaitu C-3 ($\delta= 112,5$ ppm), C-4 ($\delta= 144,23$ ppm), C-5 ($\delta= 105,3$ ppm), C-8 ($\delta= 97,8$ ppm), 1 gugus -CH₂ yaitu C-11 ($\delta= 102,3$ ppm), dan 5 atom C kwarterner yaitu: C-2 ($\delta= 160,13$ ppm), C-6 ($\delta= 150,8$ ppm), C-7 ($\delta= 150,6$ ppm), C-9 ($\delta= 144,3$ ppm), C-10 ($\delta= 112,4$ ppm), dan menunjukkan sinyal proton H-3 ($\delta= 6,29$ ppm, d,J=9,5 Hz), H-4 ($\delta= 7,90$ ppm, d, J= 9,5 Hz), H-5 ($\delta= 7,06$ ppm, s), H-8 ($\delta= 7,19$ ppm, s), dan 2 sinyal proton dari 2 atom H pada C-11 ($\delta= 1,48$ ppm, s). Spektrum massa (MS) menunjukkan berat molekul 190 Dalton dan spektrum IR (ν , cm^{-1} , KBr) menunjukkan adanya absorban maksimum pada 1710, 1630, 1570, 1470, 1460, 1130 cm^{-1} .

Aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro dari 7-metoksi kumarin dengan IC_{50} sebesar 7,173 $\mu\text{g/mL}$, lebih kuat daripada 6,7- dioksi metilen kumarin dengan IC_{50} sebesar 18,821 $\mu\text{g/mL}$.

Kandungan utama dari *E. triplinerve* sudah pernah dilaporkan oleh peneliti lain, namun aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro dari 7-metoksi kumarin dan 6,7-dioksi metilen kumarin in vitro belum pernah dilaporkan.

ABSTRACT

Keywords : *Eupatorium triplinerve* Vahl.; Asteraceae, Antimalaria, *Plasmodium falciparum*; 7-methoxy coumarin; 6,7-dioxy- methylene coumarin.

Eupatorium triplinerve Vahl is one of the herbs used in Indonesia as an antimalarial drug. In this study the components of *E. triplinerve* which has the activity as antimalaria was isolated and identified. As indicator for its antimalarial activity is the activity of isolated substances which inhibit the growth of *P. falciparum* in vitro . For the test organism *P. falciparum* strain I.2300 which is sensitive to chloroquine was used.

The test was carried out in 96 flat-bottomed micro wells in microtiter plates. The compound was dissolved and a series of six concentrations diluted in RPMI medium with 0,1% DMSO.. Aliquots of culture medium containing the compound were added to each well. Human blood with 10% erythrocyt containing 1% parasites was added to each well. After incubation in a candle jar according to the Trager and Jensen method, the parasites can be counted by staining and counting technique. The number of living schizonts with minimum 3 nuclei per 200 asexual parasites is used as the criteria of antimalaria.

Two components of *E. triplinerve* that inhibit the growth of *P. falciparum* in vitro was isolated and identified.

The first compound is 7-methoxy coumarin (= 7-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one = herniarin = ayapanin). The second compound is 6,7-dioxy methylene coumarin (6,7-dioxy methylene-2H-1-benzopyran-2-one = ayapin).

7-methoxy coumarin was proved as the more active component to inhibit the growth of *P. falciparum* in vitro with IC_{50} 7,173 $\mu\text{g/mL}$, than 6,7-dioxy methylene coumarin that inhibits the growth of *P. falciparum* in vitro with IC_{50} 18,821 $\mu\text{g/mL}$.

Both constituents of *E. triplinerne* have been reported by other researchers, but their antimalarial activities were never reported before. This report of the activity as *P. falciparum* growth inhibitor of 7-methoxy coumarin and 6,7-dioxy methylene coumarin is the first report.

D A F T A R I S I

Halaman

Lembar Judul.....	
Ucapan terimakasih.....	i
Ringkasan.....	v
Abstract.....	viii
Daftar isi	x
Daftar Tabel	xvii
Daftar Gambar	xviii
Daftar Lampiran.....	xix
Daftar Arti lambang, singkatan dan istilah.....	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tinjauan tentang malaria.....	8
2.1.1 Penyakit malaria dan permasalahannya.....	8
2.1.2 Morfologi dan daur hidup <i>Plasmodium falciparum</i>	9
2.1.3 Gejala klinik dan diagnosis malaria falsiparum.....	13

2.1.4	Pengobatan penyakit malaria	14
2.2	Tumbuh-tumbuhan sebagai obat malaria	15
2.3	Tinjauan tentang <i>Eupatorium tripllnerve</i> Vahl.....	17
2.3.1	Pertelaan tumbuhan	17
2.3.2	Kandungan kimia <i>E. tripllnerve</i> Vahl.....	20
2.4	Kemotaksonomi.....	22
2.5	Hubungan Struktur dengan aktivitas.....	22
2.6	Kandungan kimia tribus Eupatoriae.....	24
2.6.1	Seskuiterpenlaktone	24
2.6.2	Kumarin.....	25
2.6.3	Alkaloid pirolisidina.....	26
2.6.4	Flavonoid.....	27
2.7	Analisis Fitokimia	29
2.7.1	Isolasi dan Pemurnian	29
2.7.2	Kromatografi	29
2.7.2.1	Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	30
2.7.2.2	Kromatografi kolom (KK).....	30
2.7.2.3	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	31
2.7.2.4	Kromatografi Gas	31
2.7.3	Spektroskopi.....	32
2.7.3.1	Spektroskopi ultra violet.....	32
2.7.3.2	Spektroskopi infra merah.....	33
2.7.3.3	Spektroskopi Resonansi Magnet Inti (RMI)	33

2.7.3.4	Spektroskopi Massa	34
2.8	Uji aktivitas antimalaria	34
2.8.1	Metode pembiakan <i>Plasmodium falciparum</i>	34
2.8.1.1	Sinkronisasi.....	36
2.8.1.2	Penyimpanan beku biakan. (“cryopreservation”).....	37
2.8.1.3	Mencegah kontaminasi.....	38
2.8.1.4	Manfaat biakan sebagai alat penelitian.....	38
2.8.2	Pengujian efek antimalaria <u>in vitro</u>	39
2.8.2.1	Metode pengujian efek antimalaria	39
2.8.2.2	Evaluasi hasil pengujian efek antimalaria	41
2.8.2.3	Analisis data	42
BAB 3.	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	44
3.1	Kerangka Konseptual.....	44
3.1.1	Data etnofarmakologi.....	44
3.1.2	Data Kemotaksonomi.....	44
3.1.3	Teori hubungan struktur dengan khasiat.....	45
3.2	Hipotesis Penelitian.....	47
BAB 4.	METODOLOGI PENELITIAN	48
4.1	Rancangan penelitian yang digunakan	48
4.2	Populasi, sampel dan besar sampel.....	51
4.3	Variabel penelitian	52
4.3.1	Klasifikasi variabel.....	52
4.3.2	Definisi operasional variabel	53

4.4	Bahan atau materi penelitian.....	54
4.4.1	Bahan tumbuhan.....	54
4.4.2	Organisme uji.....	54
4.4.3	Bahan kimia	54
4.4.4	Media biak.....	54
4.5	Alat-alat dan instrumen penelitian.....	55
4.5.1	Alat untuk pembuatan ekstrak tumbuhan.....	55
4.5.2	Alat untuk isolasi dan pemurnian senyawa kandungan ekstrak..	55
4.5.3	Alat untuk identifikasi dan penentuan struktur kimia.....	55
4.5.4	Alat untuk uji efek antimalaria <u>in vitro</u>	56
4.6	Lokasi dan waktu penelitian.....	56
4.7	Prosedur pengambilan dan pengumpulan data.....	57
4.7.1	Penyediaan bahan tumbuhan.....	57
4.7.1.1	Pengumpulan bahan tumbuhan	57
4.7.1.2	Pemeriksaan pendahuluan terhadap bahan tumbuhan....	57
4.7.1.3	Pembuatan ekstrak tumbuhan.....	59
4.7.2	Uji aktivitas antimalaria terhadap ekstrak tumbuhan.....	60
4.7.2.1	Biakan sinambung <i>P. falciparum</i>	60
4.7.2.2	Teknik uji efek antimalaria	64
4.7.2.3	Evaluasi hasil pengujian efek antimalaria.....	67
4.7.2.4	Analisis data	67
4.7.3	Isolasi senyawa kandungan ekstrak yang aktif antimalaria	67
4.7.3.1	Isolasi dan pemurnian senyawa kandungan ekstrak	67

4.7.3.2 Uji aktivitas antimalaria terhadap isolat	69
4.7.4 Identifikasi dan penentuan struktur senyawa yang aktif	
menghambat pertumbuhan <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u>	69
4.7.4.1 Spektrum ultraviolet.....	69
4.7.4.2 Spektrum infra merah	69
4.7.4.3 Spektrum resonansi magnet inti.....	70
4.7.4.4 Spektrum massa	70
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	71
5.1 Hasil Penelitian	71
5.1.1 Determinasi tumbuhan	71
5.1.2 Hasil Pemeriksaan pendahuluan tumbuhan	71
5.1.3 Hasil pembuatan serbuk daun <i>E. triplinerve</i>	73
5.1.4 Hasil ekstraksi serbuk daun <i>E. triplinerve</i>	73
5.1.5 Hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap ekstrak.....	73
5.1.5.1 Pengamatan hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap	
ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	74
5.1.5.2 Analisis data hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap	
ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	75
5.1.6. Hasil isolasi senyawa kandungan ekstrak daun	
<i>E. triplinerve</i>	77
5.1.6.1. Isolasi dan pemurnian kandungan ekstrak eter minyak	
tanah.....	77
5.1.6.2. Isolasi dan pemurnian kandungan ekstrak kloroform....	77

5.1.7 Hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap isolat	78
5.1.7.1 Pengamatan hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap isolat.....	78
5.1.7.2 Analisis data hasil uji aktivitas antiplasmodium terhadap isolat	79
5.1.8. Hasil pengukuran spektroskopi senyawa aktif terhadap <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u>	80
5.1.8.1. Hasil pengukuran KCKT.....	81
5.1.8.2. Hasil spektroskopi isolat II	81
5.1.8.3. Hasil spektroskopi isolat III	84
BAB 6 PEMBAHASAN.....	87
6.1 Menentukan macam tumbuhan yang diteliti.....	87
6.2 Metode penelitian.....	88
6.3 Hasil ekstraksi.....	89
6.4 Uji aktivitas antiplasmodium	89
6.5 Hasil uji aktivitas anti <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u> terhadap ekstrak.....	91
6.6 Hasil isolasi senyawa kandungan ekstrak.....	91
6.7 Hasil uji aktivitas anti <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u> terhadap isolat.....	92
6.8 Hasil penentuan struktur isolat yang aktif terhadap <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u>	93
6.8.1 Hasil penentuan struktur isolat II.....	93
6.8.2 Hasil penentuan struktur isolat III.....	97
6.9 Daun Prasman (<i>E. triplinerve</i>) sebagai obat malaria	100

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	102
7.1 Kesimpulan	102
7.2 Saran	102
BAB 8. DAFTAR PUSTAKA	104
LAMPIRAN	112

D A F T A R T A B E L

Nomor Tabel	Nama Tabel	Halaman
5.1	Hasil pemeriksaan morfologi tumbuhan .	71
5.2	Jumlah skizon hidup minimal 3 inti setiap 200 Plasmodium dalam kontrol(-1),kontrol (-2), Kontrol(+1), kontrol(+2)	74
5.3	Jumlah skizon hidup minimal 3 inti setiap 200 Plasmodium dalam sumur mikro berisi ekstrak daun <i>E. triplinerve</i> .	75
5.10	Data KLT dari isolat ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	78
5.11	Persen penghambatan macam- macam isolat ekstrak daun <i>E. triplinerve</i> terhadap pertumbuhan <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u>	79
5.17	Hasil pengukuran KCKT dari isolat II dan isolat III ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	81
5.18	Hasil pengamatan spektrum ^1H -RMI dan spektrum ^{13}C -RMI dari isolat II	82
5.19	Spektrum massa isolat II dibandingkan dengan spektrum massa dari 7-metoksi-2H-1-benzopiran-2 -on.	83
5.20	Hasil pengamatan spektrum ^1H -RMI dan spektrum ^{13}C -RMI dari isolat III	85
6.1	Data spektroskopi kumarin, 7-hidroksi kumarin, 8-(2"-okso-2" metil) butoksi -7-metoksi kumarin dan 7-metoksi kumarin	95
6.2	Hasil spektroskopi isolat III dibandingkan dengan ayapin (6,7- dioksi metilen kumarin)	98

DAFTAR GAMBAR

Nomor Gambar	Nama gambar	Halaman
2.2	Tumbuhan <i>Eupatorium.triplinerve.</i> Vahl.	20
3.1	Bagan Kerangka konseptual	46
4.1	Bagan Penelitian Tahap I	49
4.2	Bagan Penelitian Tahap II	50
4.3	Bagan Penelitian Tahap III	51
4.7	Bagan Proses pembuatan bermacam- macam ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	59
4.9	Bagan Langkah-langkah uji efek antimalaria.	66
5.1	Gambar irisan melintang daun <i>E. triplinerve.</i>	94
6.1	Rumus inti kumarin	97
6.2	Rumus isolat II = 7-metoksi kumarin	97
6.3	Rumus isolat III = 6,7, dioksi metilen kumarin	99

D A F T A R L A M P I R A N

Nomor	Nama lampiran	Halaman
1	Bagan Daur hidup <i>P. falciparum</i>	112
2	Senyawa antimalaria dari tumbuhan	113-114
3	Daftar bahan kimia dan pereaksi yang digunakan	115
4	Daftar bahan kimia dan media biak untuk uji <u>in vitro</u>	116-117
5	Daftar alat-alat untuk uji aktivitas antimalaria	118
6	Bagan Proses identifikasi kandungan kimia daun <i>E. triplinerve</i>	119-121
7	Bagan siklus hidup <i>P. falciparum</i> dalam eritrosit	122
8	Hasil determinasi <i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	123
9	Perhitungan statistik kontrol negatif	124
10	Perhitungan IC_{50} ber macam-macam ekstrak daun <i>E. triplinerve</i> terhadap pertumbuhan <i>P. falciparum</i> <u>in vitro</u>	125-126
11	Analisis varian aktivitas berbagai ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	127-130
12	Perhitungan IC_{50} ber macam-macam isolat ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	131
13	Analisis varian dan perhitungan BNJ isolat ekstrak daun <i>E. triplinerve</i>	132-134
14	Hasil pengukuran KCKT isolat II dan isolat III	135-138
15	Spektrum ultra violet isolat II dan isolat III	139
16	Spektrum infra merah isolat II	140
17	Spektrum infra merah isolat III	141
18	Spektrum RMI isolat II	142-147
19	Spektrum massa isolat II	148
20	Spektrum RMI isolat III	149-153
21	Spektrum massa isolat III	154

DAFTAR ARTI, LAMBANG dan SINGKATAN .

US-NAMRU-2	United States Naval American Medical Research Unit-2
NAPRALERT	Natural PRoducts ALERT
NP/PEG	Natural Product/ Poly Ethylene Glycol.
RPMI	Rosewell Parla Memorial Institute
HEPES	N-2-Hydroxi Ethyl Piperazine N-2-Ethane Sulfonic acid
DMSO	Dimethylsulfoxide
ANAVA	Analisis varian
BNJ	Beda Nyata Jujur
TMS	Tetra Methyl Silane
KCKT	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
RMI	Resonansi Magnet Inti
MS	Mass Spectrometer = Spektrometri massa
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometer
GC-IR-MS	Gas Chromatography-Infra Red-Mass Spectrometer
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
KK	Kromatografi kolom
UV	Ultra Violet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

BAB 1

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Dalam dua dasawarsa terakhir, penyakit malaria kembali merupakan ancaman bagi kesehatan. Diperkirakan 1.5×10^9 penduduk hidup di daerah endemik malaria dan antara 1.5 - 2.7 juta setiap tahun meninggal karena malaria. Penyakit ini disebabkan oleh protozoa yang bersifat parasitik bagi manusia, yaitu : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles*. (Boyd, 1970; Bruce-Chwatt, 1986)

Semenjak tahun 1950, WHO mencanangkan penggunaan pestisida seperti DDT untuk memberantas vektor malaria, yaitu nyamuk *Anopheles*, maka ancaman malaria mulai berkurang. Namun timbulnya resistensi nyamuk *Anopheles* terhadap pestisida menyebabkan malaria kembali menjadi masalah. (Wright dkk, 1996; Butler dkk, 1997) .

Obat malaria yang paling tua ialah kuinina, alkaloid yang pada tahun 1820 berhasil diisolasi dari kulit pohon *Cinchona spec.* (kulit kina) yang semenjak abad ke 17 digunakan di Amerika Selatan sebagai obat tradisional terhadap malaria. Bangsa Inggris dan Belanda berhasil membudidayakannya di Indonesia, sehingga Indonesia merupakan penghasil kina terbesar (97%) di dunia. Perang Dunia I menyebabkan terputusnya jalur suplai kina ke Eropa, ilmuwan Jerman mulai mencari obat sintetik, maka ditemukan plasmochin (pamakuin) dan atebtrin, yang kemudian disusul senyawa lain dengan struktur kimia yang mirip dengan kuinina yaitu senyawa 4-amino kuinolin, antara lain klorokuin, amodiakuin (Covell dkk , 1950). Semenjak itu berbagai macam obat-obat sintetik seperti : primakuin (derivat 8-amino kuinolin),

mepakrin (atebrin; 9-amino akridin), proguanil (senyawa biguanidin), sulfonamid dan sebagainya, menggantikan kina sebagai obat malaria, sehingga penyakit malaria dapat diatasi (Bruce-Chwatt, 1986).

Tahun 1959 di Amerika Latin ditemukan galur *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin, yang kemudian diikuti dengan cepat di negara-negara lain, bahkan terjadi resistensi terhadap obat sintetik lain seperti golongan reduktasi asam folat (proguanil, pirimetamin) juga kombinasi sulfon dengan pirimetamin (fansidar) dan obat lain yang relatif baru dipasarkan, yaitu : meflokuin. (Harinasuta, 1982). Di Indonesia juga ditemukan galur *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin dan beberapa macam obat ("multi drug resistance"). (Oemijati, 1989, Sisirawati, 1990).

Resistensi *Anopheles* terhadap insektisida dan resistensi *Plasmodium* terhadap obat malaria yang ada, menyebabkan malaria kembali menjadi masalah kesehatan. Untuk memberantas vektor penular malaria hampir tidak mungkin, maka akan selalu terjadi kebutuhan akan obat malaria baru, juga mencari antigen untuk vaksin antimalaria.

Proses pencarian obat baru dimulai dengan mencari struktur penuntun ("lead structure", struktur induk) senyawa yaitu struktur dasar yang aktif. Dalam upaya mencari struktur penuntun tersebut dikenal 4 sumber utama (Taylor, 1993), yaitu :

1. Berdasarkan efek samping klinis dan farmakologis
2. Berdasarkan skrining secara acak
3. Berdasarkan kandungan bahan alam baik yang sudah dikenal maupun senyawa baru (dari tumbuhan, mikroba dan sumber dari lautan)
4. Berdasarkan disain rasional "de novo".

Dalam upaya mencari struktur penuntun senyawa antimalaria baru dari tumbuhan, tahun 1972 ilmuwan-ilmuwan Cina berhasil mengisolasi artemisinin (qinghaosu), senyawa seskuiterpen lakton yang terdapat dalam *Artemisia annua* L. suku Compositae (Asteraceae). Pemilihan tumbuhan tersebut didasarkan atas informasi obat tradisional Cina yang digunakan sebagai obat malaria selama ratusan tahun (Corwin, 1990; Woerdenbag, 1990). Penemuan qinghaosu merangsang peneliti lain untuk mencari bahan alam antimalaria, dan sampai sekarang masih tetap dilakukan di beberapa negara, antara lain di India, Thailand, Tanzania, bahkan juga di negara industri maju seperti Amerika. Kemajuan yang telah dicapai dalam tehnik biakan *P. falciparum* memberikan pula kemajuan dalam penelitian kemoterapi untuk menguji obat antimalaria baru, juga mencari antigen untuk membuat vaksin antimalaria (Siddiqui, 1970; Trager, 1976; Jensen, 1977; Divo dkk, 1982; Trigg, 1985; Trager, 1987).

Sebagai negara tropik, Indonesia, termasuk daerah penyakit malaria yang umum diderita oleh penduduk. Secara tradisional penduduk telah menggunakan tumbuhan sebagai obat antimalaria, antara lain : pule (*Alstonia scholaris* R.Br), daun kendal (*Ehretia buxifolia* Roxb.), daun prasman (*Eupatorium triplinerve* Vahl.), sambilata (*Andrographis paniculata* Nees.), ngokila (*Strobilanthus* sp.), johar (*Cassia siamea* Lamk.), daun sembung (*Blumea balsamifera* L.), daun papaya (*Carica papaya* L.). (Kloppenburger-Versteegh, 1915; Van Hien, 1925; Van Steenis-Kruseman, 1935; Mardisiswoyo, 1975).

Beberapa peneliti dari Thailand, India, Tanzania telah melakukan penelitian terhadap tumbuhan antimalaria dari negara masing-masing, dan diantara tumbuhan

yang diteliti ada yang tumbuh di Indonesia, yaitu: pule, sambilata, daun johar. (Broto Sutaryo, 1994)

E. triplinerve, di Indonesia dikenal sebagai daun prasman adalah salah satu tumbuhan yang dahulu selalu dijumpai di toko-toko jamu di Jawa dan digunakan untuk mengobati bermacam-macam penyakit, diantaranya sebagai obat malaria. Menurut Heyne (1950) tumbuhan tersebut banyak dijumpai tumbuh mulai dari dataran rendah sampai lebih kurang 1600 m dari permukaan laut. Tumbuhan ini juga digunakan untuk mencegah erosi dan sebagai penutup tanah di kebun karet dan teh. (Kloppenbug-Versteegh, 1915; Van Hien, 1925; Heyne, 1950). *E. triplinerve* termasuk suku Asteraceae tribus Eupatorieae, sedangkan *Artemisia annua* termasuk suku Asteraceae tribus Anthemideae. Menurut Hegnauer (1964) tumbuhan dari tribus Eupatorieae dan tribus Anthemideae dari suku Asteraceae banyak yang mengandung senyawa minyak atsiri, seskuiterpenlaktone, diterpen, triterpen, karotenoid, alkaloid, senyawa fenol seperti : flavonoid dan kumarin.

Berdasarkan kemotaksonomi, maka ada kemungkinan *E. triplinerve* mengandung senyawa seskuiterpenlaktone. Mengingat teori hubungan antara struktur dan aktivitas (Taylor, 1993), jika struktur dasar seskuiterpenlaktone tersebut sama dengan struktur penuntun artemisinin, maka kemungkinan juga bersifat antimalaria.

Beberapa senyawa yang telah diisolasi dari tumbuhan yang bersifat antimalaria antara lain senyawa : alkaloid, terpenoid (seskuiterpen, triterpen), kumarin, lignan, antranoid, flavonoid (Broto Sutaryo, 1994).

Hasil beberapa penelitian yang terdahulu diketahui bahwa *E. triplinerve* mengandung senyawa golongan kumarin. (Heyne, 1950; Van Steenis-Kruseman,

1953; Dymock, 1972; Ayensu, 1981; Chaturvedi, 1989; Woerdenbag, 1993; Chairul (1995). Mengingat teori hubungan struktur dengan aktivitas, maka senyawa kumarin yang dikandung dalam *E. triplinerve* mungkin juga bersifat antimalaria.

Senyawa lain yang mungkin terdapat dalam *E. triplinerve* seperti : flavonoid, alkaloid, terpenoid (diterpen, triterpen) bila struktur dasar sama dengan struktur penuntun senyawa antimalaria, juga ada kemungkinan bersifat antimalaria.

Publikasi mengenai isolasi dan identifikasi zat kandungan *E. triplinerve* yang berkhasiat sebagai antimalaria sampai sekarang belum ditemukan.

Bertitik tolak pada hal-hal yang tersebut di atas, *E. triplinerve* menjadi menarik untuk diteliti atas kemungkinannya dimanfaatkan sebagai penyedia bahan baku obat malaria.

1.2. Rumusan Masalah

Timbulnya resistensi *P. falciparum* terhadap obat malaria yang telah ada, mendorong peneliti mencari obat malaria falsiparum baru. Salah satu upaya ialah mencari senyawa kandungan tumbuhan yang di Indonesia secara tradisional digunakan sebagai obat antimalaria, yaitu : *E. triplinerve*, dikenal sebagai daun prasman.

Masalah yang timbul dalam upaya tersebut ialah :

1. Apakah *E. triplinerve* yang secara tradisional digunakan sebagai obat malaria, memang mempunyai aktivitas antimalaria, terutama terhadap malaria falsiparum ?
2. Jika ada, senyawa apakah yang dikandung dalam *E. triplinerve* yang mempunyai aktivitas antimalaria falsiparum ?

3. Bagaimana cara ekstraksi, isolasi, pemurnian dan identifikasi senyawa aktif tersebut?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui apakah daun *E. triplinerve* dapat digunakan sebagai obat antimalaria.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Membuktikan apakah daun *E. triplinerve* mengandung zat bioaktif yang mempunyai daya antimalaria terutama malaria falsiparum.

1.3.2.2. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa bioaktif yang mempunyai daya antimalaria falsiparum.

1.3.2.3. Mengetahui secara kuantitatif aktivitas senyawa yang mempunyai daya antimalaria falsiparum.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat berguna :

- 1.4.1. Untuk memperkaya khasanah ilmu pengetahuan dalam bidang bahan alam nabati untuk farmasi dengan informasi ilmiah yang bersifat mendasar maupun terapan, khususnya di bidang penyakit malaria.
- 1.4.2. Untuk memacu penelitian sumber daya alam nabati serta pengembangannya, terutama yang berkhasiat sebagai antimalaria.

- 1.4.3. Memanfaatkan tumbuhan obat yang tumbuh liar di Indonesia, terutama *E. triplinerve*.
- 1.4.4. Sebagai dasar pengembangan obat antimalaria, khususnya malaria falsiparum, dari bahan alam nabati, khususnya *E. triplinerve*.

BAB 2

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 tertiana (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 : Plasmodrama

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).

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

Daur hidup *P. falciparum* terdiri dari :

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

Fase aseksual mempunyai 2 daur yaitu :

2.1.2.2.11 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 $< 7,1 \text{ g\%}$.
- 4). Ikterus dengan bilirubin dalam serum $> 50 \mu\text{mol/L}$.
- 5). Gagal ginjal dengan kreatinin dalam serum $> 3,0 \text{ g\%}$ dan urine $< 400 \text{ mL/24 jam}$
- 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 plasmodium bentuk primer dalam jaringan, sehingga infeksi dapat dicegah dari awal. Pencegahan ini juga menghalangi transmisi dari manusia ke nyamuk. Obat yang digunakan berupa skizontosid jaringan, 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 skizontosid, 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. (Gillman, 1985; 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 metode 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
- 2.2.2. Golongan terpenoid.
- 2.2.3. Golongan kumarin dan lignan
- 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 *Agriomonia eupatoria* L. Marga Eupatorium termasuk dalam Eupatorieae 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 : Magnoliatae (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, daya-prana, jepana, teklan, daun panahan, daun fransman.

Di Sumatra dikenal sebagai acerang, daun panahan atau daun prasman. (Kloppenbug-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, bentuk 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 : Karang 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 seriawan mulut, busung lapar, haid tak teratur, jantung, borok, nyeri kepala, influenza, malaria, penyakit paru-paru, sebagai sudorifiuka atau tonika, obat diare. Sebagai obat luar digunakan untuk membersihkan luka, pengobatan gigitan serangga berbisa dan ditempelkan di dahi pada penderita panas (Kloppenburg-Versteegh, 1915; Heyne, 1950; Van Steenis, 1953).

Di India rebusan herba termasuk bunganya digunakan sebagai tonika pahit, ekspektoran, antiperiodik, hemostatika dan stimulansia, 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 seskuiterpenlaktone. 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 seskuiterpenlaktone,

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 Eupatoriae

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

2.6.1. Seskuiterpenlaktone

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 seskuiterpenlaktone

Seskuiterpenlaktone dapat diekstraksi dengan kloroform, metanol atau etanol (Harborne, 1984). Untuk melihat adanya seskuiterpenlaktone 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-CHCl₃-etilasetat (2:2:1). laktone dideteksi dengan disemprot H₂SO₄ pekat dan dipanaskan 100°-110° 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).

2.6.2.2. 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

Hasil penelitian terhadap *E. triplinnerve* 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).

Metode 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, partisi, 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 R_f atau hR_f . ($hR_f = 100 \times \text{harga } R_f$). $R_f = \text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal} / \text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}$.

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 teknik analisis yang didasarkan atas pemisahan fisik senyawa organik atau anorganik yang stabil pada pemanasan dan mudah diadsorpsi. 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° 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 ultra violet (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 menggambarakan 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. Teknik yang paling banyak digunakan untuk mengionkan molekul ialah teknik "electron impact" (Williams, 1980; Munson, 1981; Harborne, 1984; Roth, 1988).

2.8. Uji aktivitas antimalaria

2.8.1. Metode pembiakan *P. falciparum*

Biakan *P. falciparum* berdasarkan metode 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%.
- 2) Metode 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 metode dasar tersebut telah dilakukan.

Berbeda dengan keadaan dalam tubuh manusia, parasit dalam biakan ini segera kehilangan sinkronitasnya dan belum ada metode 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 metode 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 μm . 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 N_2 cair. Setelah beku disimpan dalam pendingin N_2 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 metode 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. Metode pengujian efek antimalaria .

Untuk pengujian efek antimalaria dari ekstrak tumbuhan dan isolat hasil kromatografi, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas teknik 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; Ratsimamanga, 1991; DEPKES R.I 1991;).

Untuk "schizont 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). Metode "schizont maturation test" didasarkan bahwa bentuk cincin (trofozoit 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 pH 6,6-6,8 kromatin merah terang, sitoplasma biru pucat). Evaluasi dilakukan dengan menghitung jumlah preskizon minimal mempunyai 3 inti yang hidup terhadap 200 parasit aseksual, kemudian dihitung persen 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 teknik "microdillution". Pada prinsipnya adalah sebagai berikut:

Parasit diinkubasi dengan obat selama 24 jam, sebelum ditambahkan [G^{-3} H] hipoksantin(0,02 μ 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 metode scintiliasi. (Kirby dkk, 1995; Wright dkk, 1996).

2.8.2.3. Analisis data

Dari data pengamatan dapat diperoleh data dalam bentuk persen penghambatan. Untuk analisis data persen penghambatan digunakan Analisis varian (ANAVA) model Rancangan tersetar, dimana sebelumnya data tersebut telah ditransformasikan ke dalam bentuk Log.Y. Jika dari data itu ada harga persen 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 ANAVA. (Analisis 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 IC₅₀

Yaitu kadar dimana persen penghambatan pertumbuhan skizon sebesar 50% .

Untuk menentukan nilai IC₅₀ digunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (probability unit) persen penghambatan dengan logaritma kadar menggunakan persamaan garis regresi linier. (Mursyidi, 1985; Ratsimamanga, 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 persen penghambatan.

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

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

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).

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.

3.1. Kerangka konseptual

Dari pendahuluan dan tinjauan pustaka yang telah diuraikan, dapat disusun kerangka konseptual penelitian sebagai berikut :

3.1.1. Data etnofarmakologi

Data etnofarmakologi memberikan informasi penggunaan tumbuhan sebagai obat secara empirik .

Dari data etnofarmakologi diketahui bahwa daun *E. triplinerve* digunakan antara lain sebagai obat malaria (Van Hien, 1915; Kloppenburg-Versteegh, 1935; Sastroamidjojo, 1967).

3.1.2. Data kemotaksonomi

Berdasarkan kemotaksonomi, tumbuhan dalam satu suku kemungkinan besar mengandung golongan senyawa yang sama. (Hegnauer, 1964).

Artemisinin atau qinghaosu, obat malaria baru yang telah diketahui sangat potensial sebagai antimalaria adalah suatu senyawa seskuiterpenlaktone yang diisolasi dari tumbuhan *Artemisia annua* dari suku Compositae (Asteraceae) tribus Antemideae (Hegnauer, 1964; Corwin, dkk, 1990.).

E. triplinerve adalah tumbuhan yang termasuk suku Compositae tribus Eupatorieae yang mungkin mengandung senyawa seskuiterpenlaktone (Hegnauer, 1964). Maka jika *E. triplinerve* mengandung senyawa seskuiterpenlaktone, ada kemungkinan bahwa strukturnya mirip artemisinin yang bersifat antimalaria.

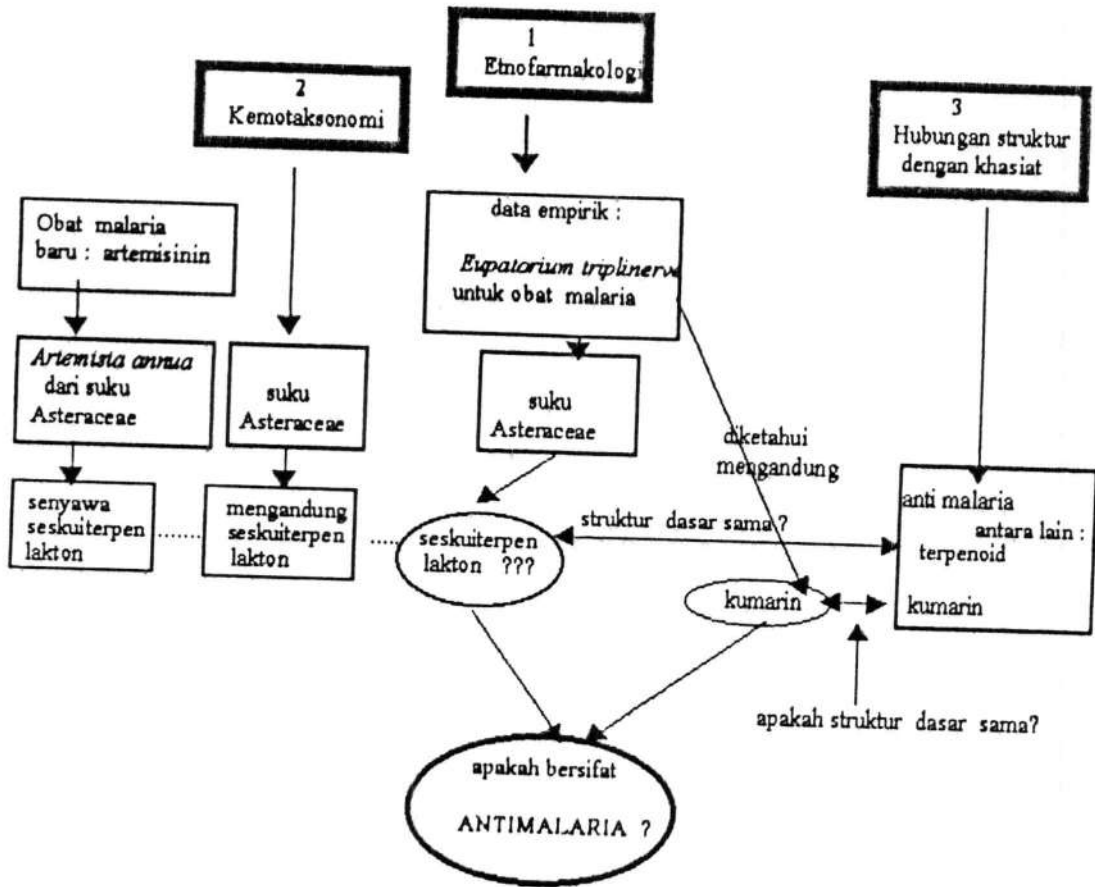
3.1.3. Teori hubungan struktur dengan khasiat

Berdasarkan teori hubungan antara struktur dan khasiat, maka senyawa dengan struktur dasar yang sama mempunyai khasiat yang tidak berbeda.

Dari beberapa penelitian tumbuhan antimalaria, diketahui bahwa beberapa macam senyawa dari tumbuhan yang bersifat antimalaria yaitu menghambat pertumbuhan *P. falciparum in vitro* antara lain adalah senyawa seskuiterpenlakton dan kumarin. (Broto Sutaryo, 1994).

Dari penelitian yang terdahulu diketahui bahwa *E. triplinerve* mengandung senyawa kumarin dan terpenoid. (Nadkarni, 1890; Burkill, 1932; Bose, 1936; Jain, 1976; Nadkarni, 1890; Chaturvedi, 1989.), maka ada kemungkinan senyawa kumarin yang dikandung dalam *E. triplinerve* mempunyai struktur sama dengan kumarin yang bersifat menghambat pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

Bagan kerangka konseptual adalah sebagai berikut:



Gambar : 3.1. Bagan kerangka konseptual

Menggunakan pendekatan-pendekatan teoretik tersebut di atas, yaitu :

1. Etnofarmakologi : memanfaatkan indikasi empirik penggunaan bahan tumbuhan sebagai obat.
2. Kemotaksonomi : mencari tumbuhan lain dari suku yang mengandung zat sejenis yang terbukti aktif
3. Teori hubungan struktur dan khasiat : mencari senyawa dengan struktur dasar yang sama dengan zat yang telah terbukti aktif.

Maka dapat diduga bahwa :

- 1) *E. triplinerve* mungkin mengandung zat yang mempunyai khasiat sebagai antimalaria (menghambat pertumbuhan *P. falciparum* in vitro).
- 2) Zat yang mempunyai aktivitas sebagai antimalaria kemungkinan senyawa golongan seskuiterpenlaktone dan / atau kumarin.

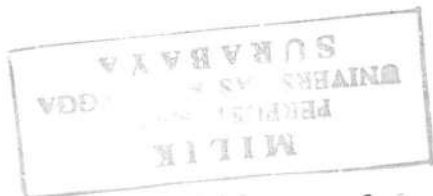
Telah dilakukan uji pendahuluan efek *P. falciparum* in vitro terhadap sari daun *E. triplinerve* dalam air, metanol, eter minyak bumi dan diklormetan. Yang digunakan galur *P. falciparum* asal Flores yang sensitif terhadap HCl kuinina. Dalam dosis kurang dari 100 ug / 10 uL maka sari dalam air dan sari dalam metanol menunjukkan penghambatan pertumbuhan skizon sebanyak 50% dibandingkan dengan kontrol (Broto Sutaryo, 1990).

3.2. Hipotesis Penelitian.

Dari kerangka konseptual tersebut di atas dapat disusun hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Daun *E. triplinerve* bersifat antimalaria .
2. Senyawa kandungan daun *E. triplinerve* yang bersifat antimalaria adalah senyawa seskuiterpenlaktone dan / atau kumarin.

BAB 3



BAB 4

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian yang digunakan.

Daun *E. triplinerve* dikeringkan dan dibuat serbuk, kemudian diperiksa senyawa kimianya dengan metode 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.

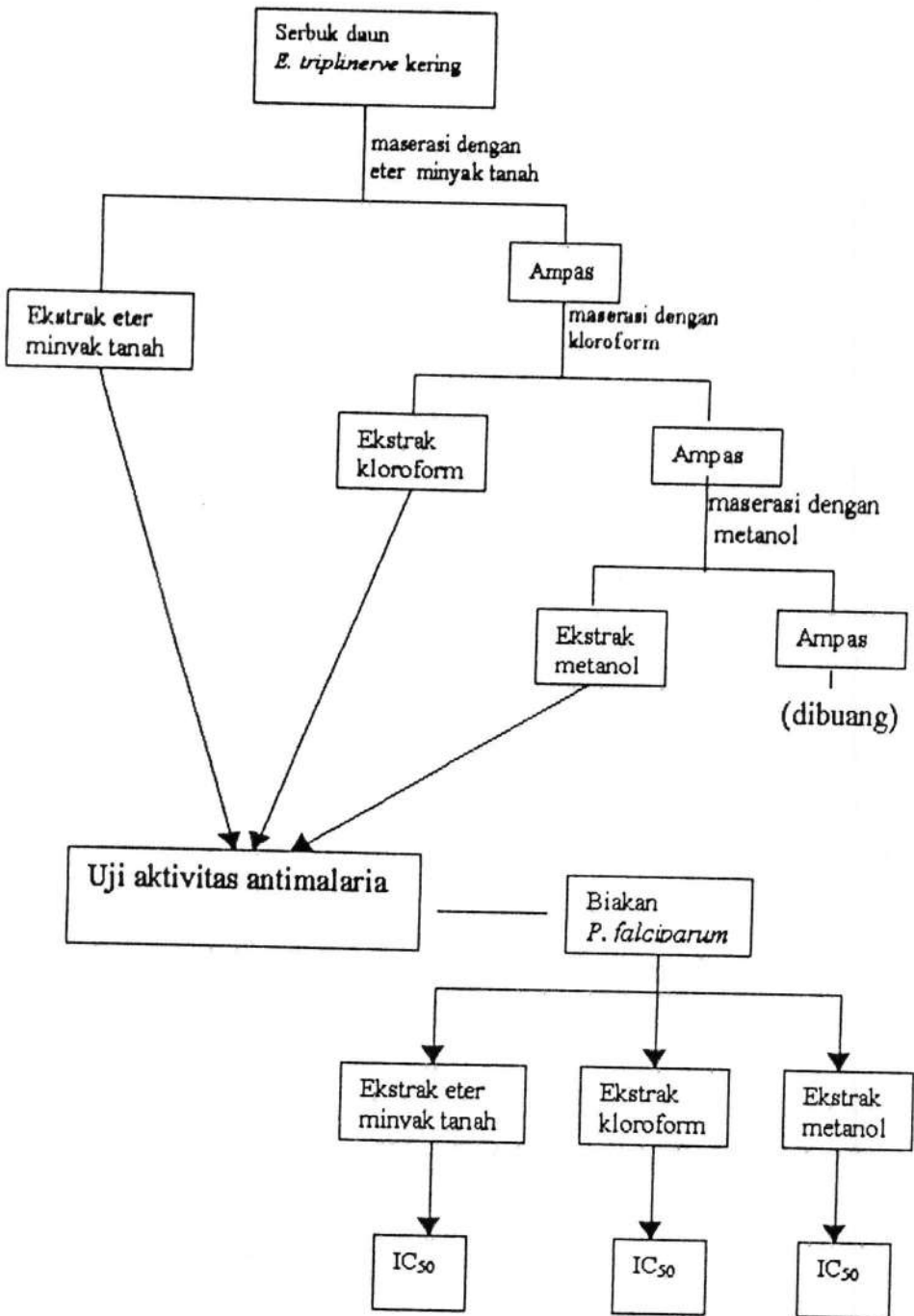
Tahap II :

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.

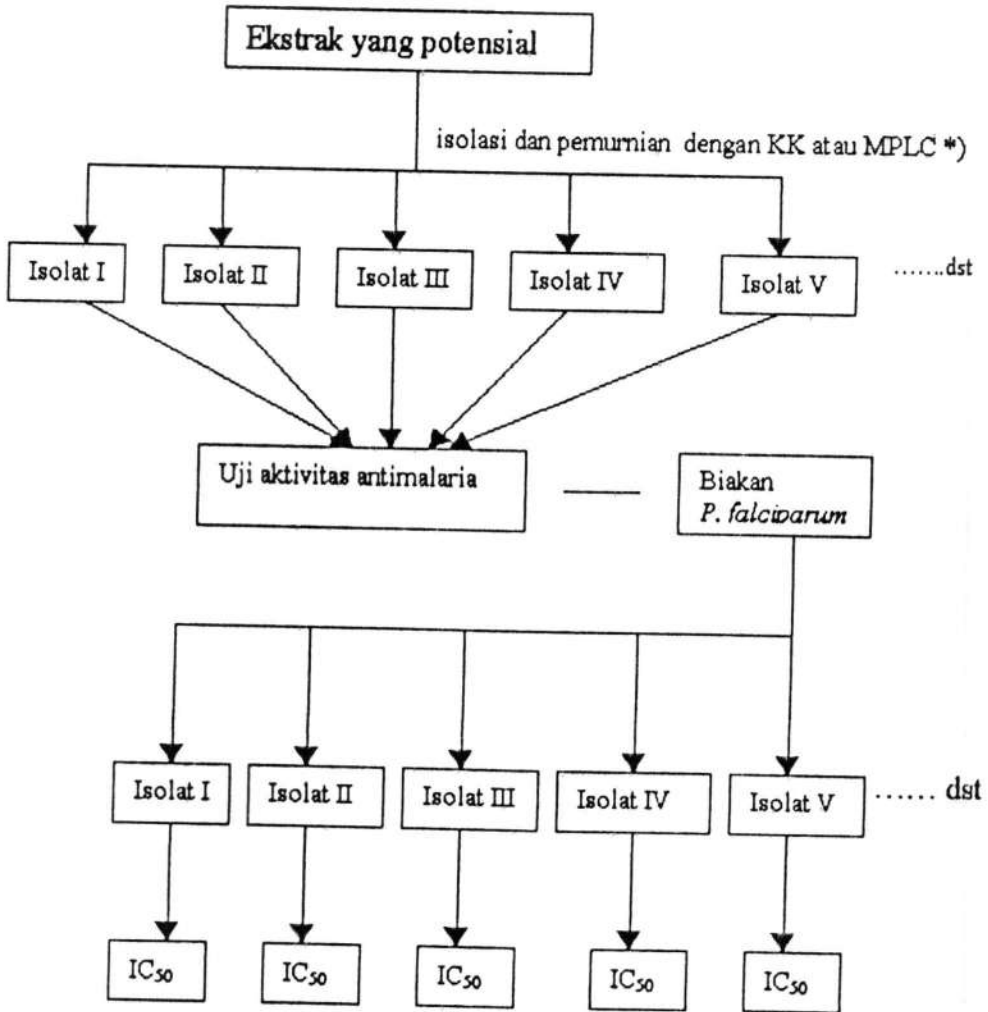
Tahap III :

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 :

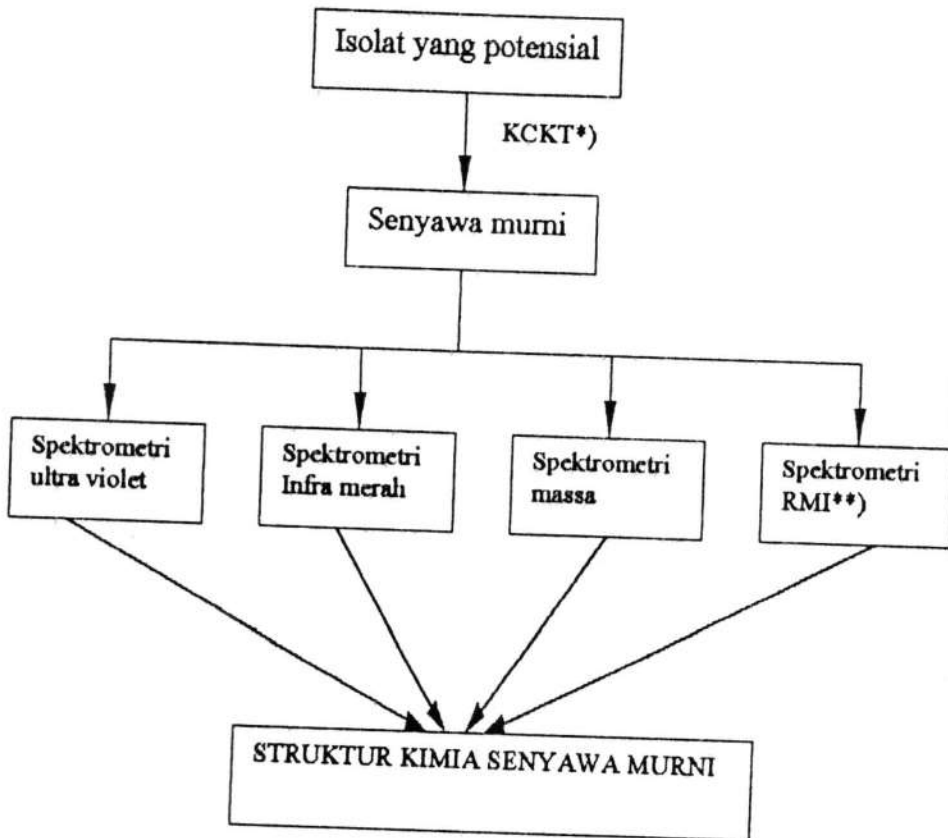


Gambar : 4.1 Bagan Penelitian Tahap I.



Gambar : 4.2 Bagan Penelitian tahap II

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



Gambar : 4.3 Bagan Penelitian Tahap III

*) KCKT = Kromatografi cair kinerja tinggi.

***) RMI = Resonansi magnet inti

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 persaratan, 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 IC_{50}).

Pada pemisahan dan pemurnian senyawa isolat, variabel utama adalah ekstrak yang potensial, variabel bebas adalah metode 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 IC_{50}).

Pada penentuan struktur senyawa murni, variabel utama adalah senyawa murni, variabel bebas adalah metode 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 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* galur I. 2300 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. triplinnerve* 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.Merck dengan derajat murni pereaksi ("pro analisis"). 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, persaratan eritrosit dan serum 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 : Buchi 681 Chromatography pump.
- Kolom : Buchi, 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 Gf 254, 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. Metode organoleptik

Pemeriksaan organoleptik terhadap tumbuhan dilakukan dengan membandingkan dengan data pustaka untuk identifikasi bentuk, warna, bau dan rasa tumbuhan, batang,

daun, bunga dan buah.

4.7.1.2.2. Metode 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. Metode fitokimia

Dilakukan uji fitokimia pendahuluan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalamnya. Metode berdasarkan atas sifat fisikokimia dari golongan senyawa tersebut (Ciulei, 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 dikandungnya. 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.

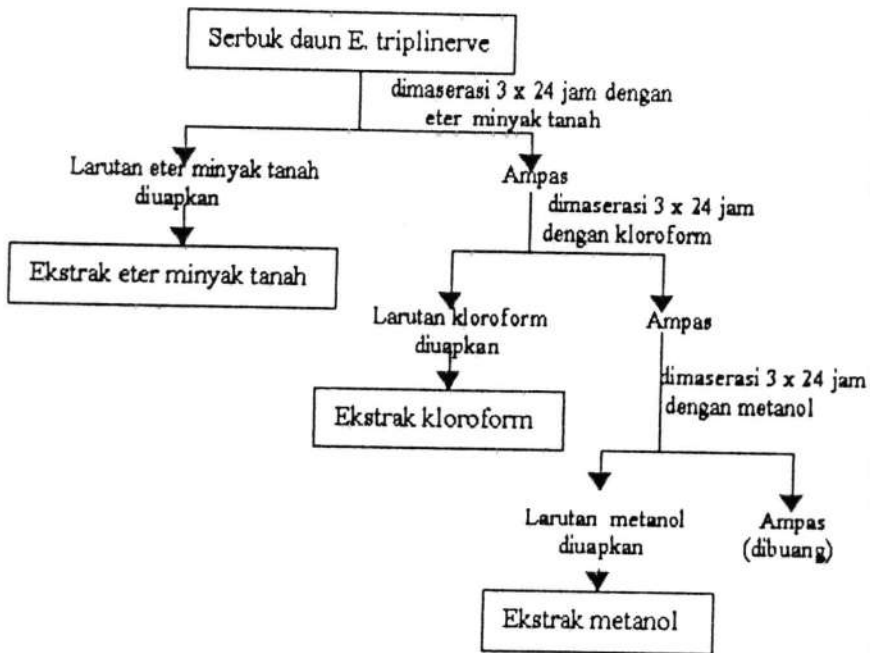
Dari sari III dilakukan identifikasi terhadap alkaloid.

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 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 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 CO_2 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 diambil dari darah golongan O dari relawan sehat dan tidak sedang minum obat-obatan. Serum harus diambil dari darah segar melalui alat suntik steril dimasukkan kedalam tabung sentrifuga steril didiamkan pada suhu kamar atau $37^\circ C$ 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 $4^\circ C$. baru dapat digunakan . Kemudian disimpan pada suhu $-20^\circ C$.

4.7.2.1.3.5. Medium blakan (RP-HS).

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

4.7.2.1.4. Penyiapan eritrosit

Sebanyak 10 mL darah yang telah disimpan pada $4^\circ C$ dalam CPD atau ACD (dapat diperoleh dari PMI) dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga bertutup dengan volume 40 mL., kemudian disentrifuga dengan putaran 1800 putaran / menit selama 8-10 menit pada suhu $4^\circ - 20^\circ C$. 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. Dibagi-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

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. Teknik 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:

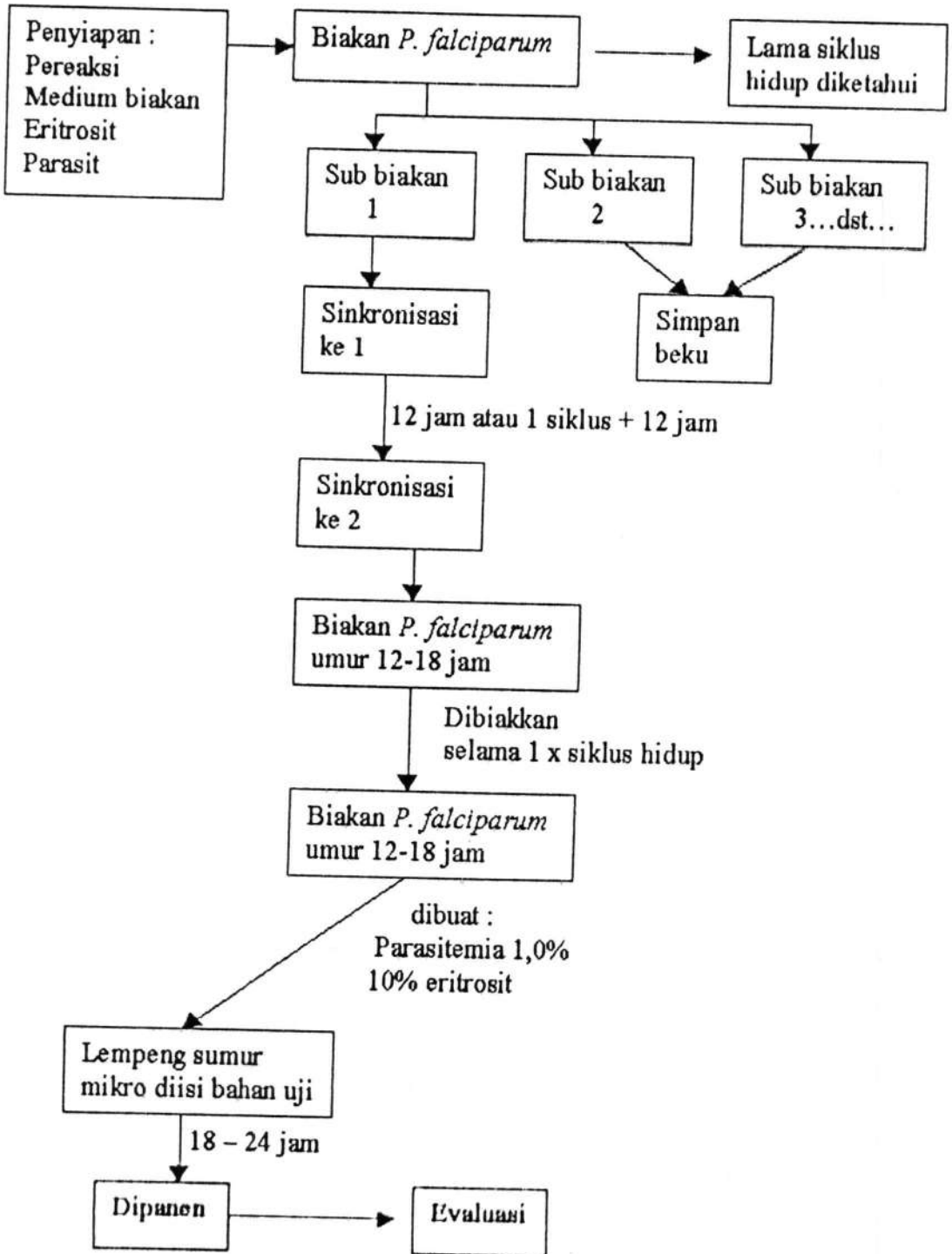
Kontrol (-1): 180 μL RPHS; Kontrol (-2) :180 μL RPHS-DMSO

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 persen penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* terhadap kontrol negatif. Kemudian dihitung IC_{50} dari masing-masing ekstrak.

4.7.2.4. Analisis data

Dari data persen 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(ANAVA).
3. Efektivitas persen penghambatan 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 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 *E. 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 MHz). 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.

BAB 5

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

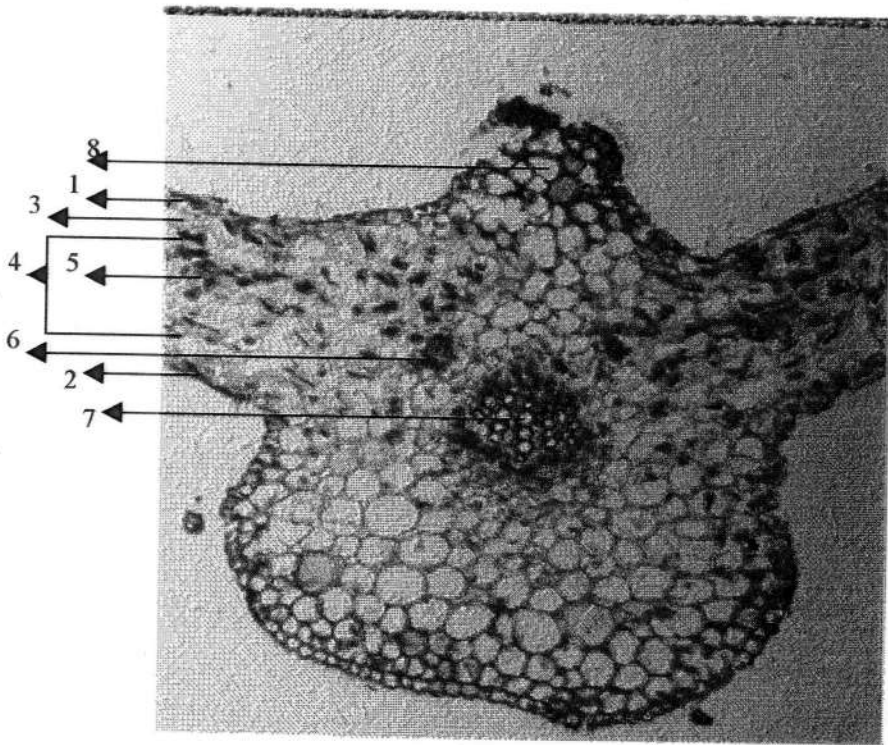
Tabel : 5.1

Data morfologi tumbuhan dibandingkan pustaka

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	

5.1.2.2. 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 .

5.1.2.2. 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
Metan- ol	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 IC_{50}

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

Harga IC_{50} dari bermacam-macam ekstrak ditemukan sebagai berikut (Lampiran 10): Ekstrak dalam eter minyak tanah : IC_{50} sebesar 2,25 $\mu\text{g/mL}$

Ekstrak dalam kloroform IC_{50} sebesar 14,78 $\mu\text{g/mL}$

Ekstrak dalam metanol : IC_{50} sebesar 27,24 $\mu\text{g/mL}$

5.1.5.2.2. Analisis varian (ANOVA)

Hasil 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 \rightarrow etil asetat) diperoleh 2 isolat sebagai berikut:

Isolat I :

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

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 mg)

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 \rightarrow 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 mg).

Terhadap ketiga isolat tersebut dilakukan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) diperoleh hasil seperti pada Tabel : 5.10

Tabel : 5. 10 .

Data KLT isolat ekstrak daun *E. triplinerve*. *)

Isolat	Bentuk isolat	Warna bercak	Rf
I	Hablur bentuk jarum dan lempeng, warna putih	Kuning tua	0,20
II	Hablur bentuk lempeng, jernih, tak berwarna	Fluoresensi ungu	0,18
III	Hablur 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 persen penghambatan bermacam-macam isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro seperti tertera pada Tabel : 5.11

Tabel : 5.11.

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

Isolat	Pengu- langan	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
I	1	55	18	13	12	4	0	-
	2	60	31	18	17	8	0	-
	3	50	18	8	4	5	0	-
	Rata2 SD (\pm)	55 5,0	22 7,5	13 5,0	11 6,5	5,6 2,1	0	-
II	1	-	100	98	78	58	44	27
	2	-	98	100	76	49	47	30
	3	-	100	100	78	67	31	42
	Rata2 SD (\pm)	-	99,3 1,15	99,3 1,15	77,3 1,15	58 9,0	40,6 8,5	33 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 SD (\pm)	100 0	100 0	84,7 4,9	64,7 4,5	31,3 6,43	6 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 harga 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).

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

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

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 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 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 $1500\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$); $-\text{CH}_3$; $=\text{CH}_2$; $\equiv\text{CH}$ (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.

Spektrum ^1H -RMI		Spektrum ^{13}C -RMI			^1H - ^1H cosy	^{13}C - ^1H cosy
Nomor atom H	δ (ppm) *)	Nomor atom C	δ (ppm)	DEPT**)		
2	-	2	162,8	C	-	-
3	6,213 (1H,d,J=9Hz)	3	112,9	CH	H-3, H-4	C-3
4	7,614 (1H,d,J=9 Hz)	4	143,4	CH	H-4, H-3	C-4
5	7,344 (1H,d,J=8,5 Hz)	5	128,7	CH	H-5, H-6	C-5
6	6,810 (1H,dd, J=8,5 Hz; 2,5 Hz)	6	112,5	CH	H-6, H-5, H-8	C-6
7	-	7	161,2	C	-	-
8	6,771 (1H,d,J=2 Hz)	8	100,8	CH	H-8, H-6	C-8
9	-	9	155,8	C	-	-
10	-	10	112,5	C	-	-
11	3,840 (3H,s)	11	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- benzopira n-2-on	7 metoksi –2H-1- benzopira n-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 $1500-1610\text{ cm}^{-1}$); $-CH_3$, $=CH_2$, $-CH$ (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 DMSO- d_6 , 40.0 C/ 313.1 K) dan spektrum ^{13}C -RMI (125 Mhz DMSO- d_6 , 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 H	δ (ppm) *)	Nomor atom C	δ (ppm)	DEPT**)		
2	-	2	160,13	C	-	-
3	6,29 (1H,d,J=9,5 Hz)	3	112,5	CH	H-3, H-4	C-3
4	7,90 (1H,d,J=9,5 Hz)	4	144,23	CH	H-4, H-3	C-4
5	7,19 (1H,s)	5	105,3	CH	-	C-5
6	-	6	150,8	C	-	-
7	-	7	150,6	C	-	-
8	7,06 (1H,s)	8	97,8	CH	-	C-8
9	-	9	144,3	C	-	-
10	-	10	112,4	C	-	-
11	6,148 (2H,s)	11	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% dimetilpolisiloksan) 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.

BAB 6

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1. Menentukan macam tumbuhan yang diteliti

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

Pemilihan tumbuhan yang akan diteliti bertitik tolak pada senyawa seskuiterpenlaktone yaitu artemisinin yang ditemukan dalam tumbuhan suku Asteraceae. Berdasarkan kemotaksonomi, tumbuhan lain dari suku Asteraceae mungkin mengandung senyawa seskuiterpenlaktone 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.

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

Selain seskuiterpenlaktone (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 seskuiterpenlaktone (golongan terpenoid) dan / atau kumarin.

6.2. Metode 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.

Hasil 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.

Dengan demikian 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. Pembiakan 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 IC_{50} 2,25 µg/mL, kemudian ekstrak kloroform dengan IC_{50} 14,78 µg/mL. dan yang paling kurang potensial adalah ekstrak metanol dengan IC_{50} 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

Perhitungan dengan pendekatan analisis probit, dari kadar isolat untuk uji aktivitas anti *P. falciparum* in vitro sebesar 3,125 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; dan 100 $\mu\text{g/mL}$ 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} 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.

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 $-\text{CH}_3$; $=\text{CH}_2$; $=\text{CH}$ dan $=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{}$.

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 (Lampiran 19)..

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

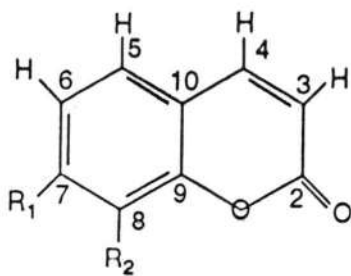
Analisis dengan RMI-proton, RMI-karbon dan DEPT, diketahui bahwa: jumlah atom C = 10, atom H = 8. Juga terdapat atom H singlet pada geseran kimia 3,840 ppm, atom karbon dengan geseran kimia 55,68 ppm dari gugus CH_3 .

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)
$^1\text{H-RMI}$	(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
$^{13}\text{C-RMI}$	(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 : $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$

7-hidroksi kumarin : $R_1 = -\text{OH}$; $R_2 = -\text{H}$

7- metoksi kumarin : $R_1 = -\text{OCH}_3$; $R_2 = -\text{H}$

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

$R_1 = -\text{OCH}_3$;

$R_2 = -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_3$

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.

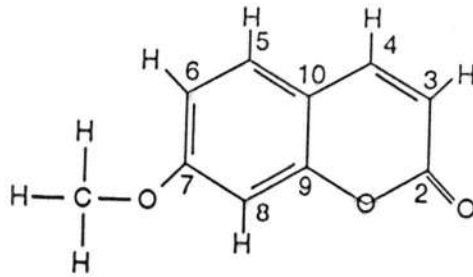
Spektrum IR dari isolat II dan 7-metoksi kumarin, keduanya identik

Berdasarkan data-data yang ditemukan, diduga 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 sesuai dengan data KLT 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 kumari = 7-metoksi-2H-1-benzopiran-2-on= herniarin = ayapanin

6.8.2. 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 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 .

Hasil 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.

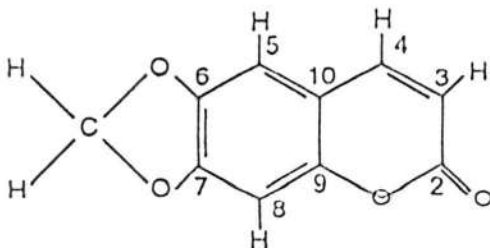
Tabel : 6. 2.

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 ($\sqrt{\text{cm}}^{-1}$) (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) .



= ayapin

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

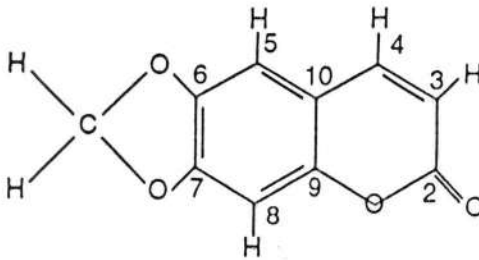
Data spektrum IR menunjukkan kesamaan gugus fungsi.

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. triplinnerve* 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.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka daun prasman yang secara tradisional digunakan sebagai obat malaria, ternyata memang dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* galur I. 2300 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. Hasil percobaan yang telah dilakukan, ternyata IC₅₀ dari ekstrak lebih kecil daripada IC₅₀ masing-masing senyawa kumarin tersebut. Hal ini disebabkan karena ekstrak mengandung beberapa senyawa diantaranya kedua

senyawa kumarin tersebut, yang menghambat pertumbuhan *P. falciparum* I. 2300. Maka ada kemungkinan bahwa penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* I. 2300 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. Jadi perlu dilakukan penelitian toksisitas daun prasman, khususnya penelitian toksisitas dari kedua senyawa kumarin tersebut.

BAB 7

BAB 7 : KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Daun prasman atau *Eupatorium triplinerve* Vahl. yang di Indonesia secara tradisional pernah digunakan sebagai obat antimalaria, ternyata dapat dibuktikan memang menghambat pertumbuhan *P. falciparum* in vitro, khususnya *P. falciparum* I. 2300.
2. Senyawa kandungan daun *E. triplinerve* yang bersifat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* I. 2300 in vitro ialah 7-metoksi-2H-1-benzopiran-2-on (= 7-metoksi kumarin = herniarin = ayapanin) dengan IC_{50} 7,17 $\mu\text{g/mL}$ dan 6,7 dioksi metilen 2H-1-benzopiran-2-on (= 6,7 dioksi metilen kumarin = ayapin), dengan IC_{50} 18,82 $\mu\text{g/mL}$.

7.2. Saran

1. Diteliti aktivitas anti *Plasmodium falciparum* baik galur I.2300 dan galur lainnya dari campuran 7 metoksi kumarin dan 6,7-dioksi metilen kumarin, untuk mengetahui apakah ada sifat sinergis dari kedua senyawa tersebut.
2. Diteliti aktivitas anti *Plasmodium falciparum* baik galur I 2300 dan galur lainnya dari rebusan daun prasman, sesuai dengan penggunaannya secara tradisional sebagai obat malaria.

3. Diteliti toksisitas dari 7-metoksi kumarin, 6,7-dioksi metilen kumarin dan rebusan daun prasman.
4. 7-metoksi kumarin dan 6,7-dioksi metilen kumarin dapat dikembangkan lebih lanjut untuk digunakan sebagai senyawa penuntun ("lead structure") dengan dilakukan modifikasi molekul untuk meningkatkan aktivitasnya sebagai anti *P. falciparum*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA.

- Ayensu ES, 1981. **Medicinal Plants of West Indie**. Michigan : Reference Publications Inc. hal. 80-81.
- Backer CA, Van de Brink BRC, 1963. **Flora of Java**. (Spermatophyte only). Groningen The Netherlands : Wolters Noordhoff N.V. hal. 377-379.
- Beales, P. 1981 : Malaria parasite strain characterization, cryopreservation and banking of isolates. A WHO memorandum. **Bull. of the WHO**. 59: 537-548.
- Boyd MF, 1970. **Malariaology**: A comprehensive survey of all aspects of the group of diseases from a Global standpoint. (By sixty five contributors) Vol. I & II. Philadelphia : WB Saunders Company .hal. 29-1089.
- Bose PK, Roy AC, 1935. The constitution of Ayapanin. **J. Indian Chem. Soc.** 13: 586-587.
- Brait Maier E & Voelter W, 1987. **¹³C NMR Spectroscopy**. Verlag-Chemie Weinheim New York. Hal. 297
- Broto-Sutaryo SM, 1992. Percobaan Kultur *Plasmodium falciparum* dan Uji Pendahuluan Efek beberapa Macam Ekstrak Daun *Eupatorium triplinerve* Vahl Terhadap *P. falciparum* in vitro. Laporan Internship P.A.U. Bag Ilmu Hayati ITB Bandung .
- Broto-Sutaryo SM, 1994. Tumbuhan Sebagai Sumber Obat Antimalaria . **Bull ISFI** 22 (1): 8 - 20.
- Bruce- Chwatt LJ, 1986. **Essential malariaology** 2nd ed. London : William Heinemann Medical Books. hal.32-50.
- Butler E, Maurice J, O'Brien C, 1997. Time to put malaria control on the Global agenda. **Nature** 386: 435-541
- Burkill IH, Birtwistle W, Foxworthy FW, Scrivenor JB, Watson JG, 1935. **A Dictionary of Economic Products of The Malay Peninsula** . London : Mill Blank hal. 976-977.
- Chairul, Janti, Broto-Sutaryo S, 1995. Isolasi dan identifikasi senyawa kumarin dari daun prasman (*Eupatorium triplinerve* Vahl). Simposium Nasional I APINMAP di Bogor .

- Chaturvedi R , Mulchandani NB, 1989 : Coumarins from *Eupatorium ayapana* J **Indian Chem Soc.** (66), 286-287
- Ciulei, 1984. **Methodology for Analysis of Vegetable Drugs.** Bucharest, Rumania: Industrial Operations Unido, Faculty of Pharmacy. 1984; 11-23.
- Covell G, Coatney GR, Field JW, Singh J, 1955. **Chemotherapy of Malaria.** Geneva, WHO . hal. 10-13
- Corwin H, Sammes PG, Taylor JB, 1990. **Comprehensive Medicinal Chemistry I** 1^e Ed New York : Pergamon Press Oxford hal. 99-111.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1979. **Farmakope Indonesia Ed. III .**
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1991: **Malaria 7.** Pemeriksaan Parasit malaria Secara mikroskopik. hal. 8 - 59.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1991. **Malaria 9.** Tes Resistensi untuk *Plasmodium falciparum* hal. 40 - 48.
- Diem Trang N, Wanner MJ, Ngoc Phuong LV, Koomen GJ, Xuan Dung N, 1992. **Thymoquinone** from *Eupatorium ayapana*. **Planta Med.** 59(1): 99
- Diem Trang NT, Xuan Dung N, Ngoc Phuong LV, Wanner M, Koomen GJ, 1992. The ¹³C-NMR Spectroscopy of ayapin isolated from *Eupatorium ayapana* Vent from Vietnam. **Tap chi Hoa hoc** T. 30, So 4, Tr. 62-63.
- Divo AA, Jensen JB, 1982. Studies on serum requirement for the cultivation of *Plasmodium falciparum*. 2. Medium enrichment. **Bull of the WHO**; 60: 571-75.
- Dymock W, 1890 : **Pharmacographia Indica.** Pakistan. Hamdard, The Institute of Health and Tibbi Research. hal. 225.
- Fairlamb AH, Warhurst DC, Peters W, 1985. An improved technique for the cultivation of *Plasmodium falciparum* in vitro without daily medium change. **Annals of Trop Med and Parasitol** 79: 379-84.
- Farnsworth NR, 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. **J of Pharm Sc** 55 (3): 265
- Gandahusada S, Pribadi W, Ilahude HD, 1990. **Parasitologi Kedokteran.** Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. hal. 125-55.

- Gan S, 1987. **Farmakologi dan terapi**. Ed. III. Jakarta. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta . hal. 422-435.
- Garg SC, Nakhare S, 1992. **Medicinal and Aromatic Plants Abstracts No.3 Vol. 14** New Delhi . hal.290-291.
- Geary TG, Dios AA, Jensen JB, 1983. An in vitro assay system for the identification of potential antimalarial drugs. **J Parasitol.** 69 (3): 577-583.
- Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F, 1985. **The Pharmacological Basic of Therapeutic**. New York : Mc Millan Publishing Company. hal. 1029-1043.
- Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE, 1991. **Pengantar Kromatografi Ed.II**. Penerjemah: Padmawinata. Bandung, ITB hal. 186-234.
- Harborn JB, 1984 : **Phytochemical Methods**. London : Chapman and Hall . hal 1-30; 100-141.
- Harinasuta T, Dixon KE, Warrell DA, Doberstyn EB, 1982. Recent advances in malaria with special reference to Southeast Asia. **Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth** 13: 1-34.
- Hegnauer R, 1964. **Chemotaxonomie der Pflanzen Band 3**. Stuttgart: Birkhauzen Verlag hal.447-456, 509-510, 522-523
- Heyne K, 1950. **De Nuttige Planten van Indonesie** Bandung : N.V.Uitgeverij, W van Hoeve s'Gravenhage.
- Jain TC, Striha RJ, 1976. Semmler's hydrocarbon from *Eupatorium ayapana*. **Phytochemistry** 15 : 847-848.
- Jeffrey HC, Leach RM, 1968. **Atlas of Medical Helminthology and Protozoology**. Edinburgh : E.S. Livingstone Ltd.
- Jensen JB, Trager W, 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. **The J of Parasitol.** 63 (5) : 883-886.
- Jensen JB, 1983. **In vitro cultivation of Protozoan Parasites**. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton 155-182.
- Khalid SA, Farouk A, Geary TG, Jensen JB, 1986. Potential antimalarial candidates from African plants : an in vitro aproach using *Plasmodium falciparum* **J of Ethnopharmacol** 15: 201

- Kirby GC, Paine A, Warhurst DC, Noamese BK, Phillipson JD, 1995. In vitro and in vivo Antimalarial Activity of Cryptolepine, a Plant-derived Indoloquinoline. *Phytochemistry Research* 9: 359-363.
- Kloppenburger-Versteegh J, 1915. Wenken en Raadgevingen betreffende het gebruik van Indische Planten, vruchten enz. 3e verbeterde druk Den Haag: G.C.T. van Dorp & Co. 243-245.
- Lambros C, Vanderberg JP, 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol* 65 (3): 418-420.
- Macek K, 1972. Pharmaceutical applications of Thin layer and paper chromatography. Amsterdam-London-New York. Elsevier Publishing Company. hal. 1-60; 563-567.
- Mc Nair HM, Bonelli EJ, 1988 : **Dasar Kromatografi Gas**. Bandung : Penerbit ITB .
- Mardisiswoyo S, Mangoensoedarso HR , 1975: **Cabe puyang warisan nenek moyang**. Cet ke 2. Jakarta: P.T. Karya Wreda . hal 162.
- Markham KR, Mabry TJ, Thomas MB, 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. New-York-Heidelberg-berlin. Springer Verlag hal. 3-13
- Martindale, 1993. **The Extra Pharmacopoea** Ed. XXX. Editor:Reynolds JEF.London, The Pharmaceutical Press.
- Moore GE, Gerner RE, Franidin HA, 1967. RPMI Media 1640. *JAMA* 199: 56-57.
- Morakote N, Charuchinda K, 1988. Storage of red cells for in vitro cultivation of *Plasmodium falciparum*. *Annals of Trop Med and Parasitol* 82: 625-626.
- Mulja M, Syahrani A, 1992. **Kromatografi Gas. Teori Dasar, Instrumentasi dan Aplikasi**. Surabaya .
- Munson JW, 1981. **Pharmaceutical Analysis. Modern Method**. Part B Vol II. Michigan : The Upjohn Company Kalamazzoo. hal.14-63, 144-163, 155-176.
- Mursyidi A, 1984. **Statistika Farmasi dan Biologi**. Jakarta, Ghalia Indonesia. hal 57-72.
- Nadkarni KM, 1978. **Indian Materia Medica** vol I. Bombay. Panvel: Popular Book report Bombay 7. Dootapapeshwar Prakashan Ltd. hal. 521-22.

- Okpako DT, 1991. **Principles of Pharmacology. A tropical approach.** Cambridge University Press. hal. 51-56.
- Oemijati S, 1989. The current situation of Parasite infections in Indonesia . **Bull. Penelitian Kesehatan.** 17(2): 14
- Oemijati S, 1991. **Masalah Malaria di Indonesia.** Kumpulan Makalah Simposium Malaria Jakarta : FKUI hal. 2-3.
- O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, 1985. Plants as sources of antimalarial drugs Part I. In vitro test method for the evaluation of crude extract from plants. **Plant. Med** 5: 394-397.
- Osisanya JDS, 1981. Short communications: A simplified culture technique for *Plasmodium falciparum*. **Annals of Trop Med and Parasitol.** 75: 107-109
- Pavanand K, Permpnich B, Chuanak N, Sookto P, 1974. Preservation of *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes for in vitro cultures. **J Parasitol.** 60: 537-539.
- Phillipson JD, 1991. Assays for antimalarial and amoebicidal activities In : Dey PM & Harborne JB : **Methods in plants biochemistry Vol 6. Assays for bioactivity.** London : Academic Press Harcourt Brace Jovanovich Publisher hal. 135-152.
- Rahman AH, Shabbir M, Sultani SZ, Jabbar A, Choudhary MJ, 1997. Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*. **Phytochemistry** 44(4); 683-685.
- Ratsimamanga-Urverg S, Rasoanaivo P, Rakoto-ratsimamanga A, Le Bras J, Ramiliarisoa O, Savel J, 1991. Antimalarial Activity and Cytotoxicity of *Ficus pyrifolia* and *Rhus (=Baronia) taratana* Leaf and Extracts. **Phytoter. res.** 5(1): 32-34.
- Reese RT, Langreth SG, Trager W, 1979. Isolation of stages of the human parasite *Plasmodium falciparum* from culture and from animal blood. **Bull of the WHO** 57 (Suppl I): 53-61
- Rieckmann KH, 1982. Visual in-vitro test for determining the drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. **The Lancet** June 12: 1333-35.
- Robards K, Haddad PR, Jackson PE, 1994. **Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods.** London .Academic press Harcourt brace & Company, Publishers.hal. 8-23.

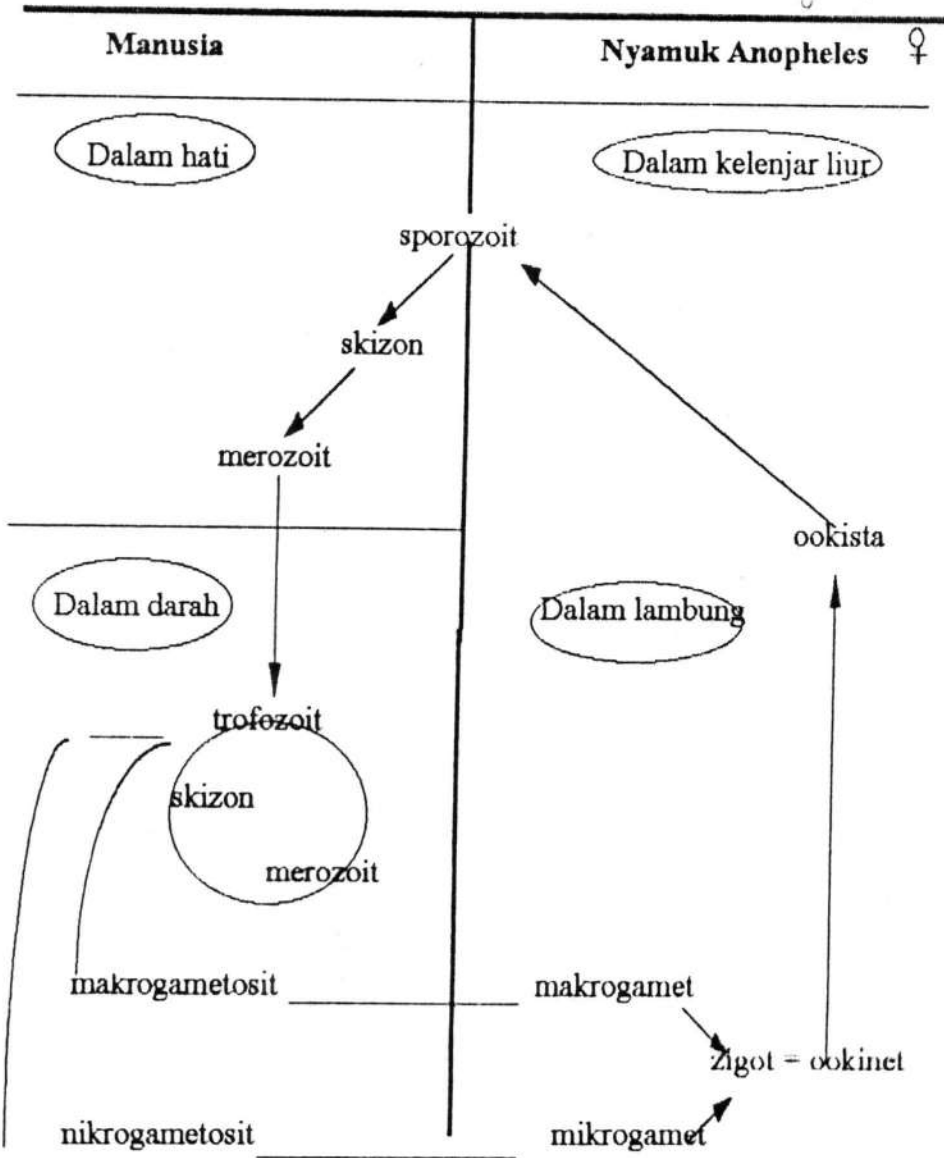
- Roberts M, Reiss M, Monger G, 1993. **Biology. Principles and Processes.** United Kingdom. Thomas Nelson & Sons Ltd. hal. 100-107.
- Roth HJ, Blaschke G, 1988. **Analisis Farmasi.** Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. hal. 372-90, 419-31.
- Sastroamidjojo AS, 1967. **Obat asli Indonesia.** Jakarta: P.T. Dian Rakyat hal. 108-109.
- Sastroamidjojo H, 1985. **Kromatografi.** Yogyakarta : Penerbit Liberty hal. 1-5, 26-40.
- Shimomura H, Sashida Y, Ohshima Y, 1979. Coumarins from *Artemisia apiacea*. **Phytochemistry** 18: 1762-63
- Siddiqui WA, Schnell JV, Geiman QM, 1970. In vitro cultivation of *Plasmodium falciparum*. **The Am J of Trop Med and Hyg.** 19 (4) : 586-91
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC, 1981. **Spectrometric Identification of Organic compounds** 5th Ed. Canada : John Wiley & Sons Inc. hal. 137.
- Sisirawati, 1990. Pemeriksaan sensitivitas *P.falciparum* in vivo dan in vitro terhadap klorokuin pada Penderita malaria falsiparum di Timor Timur . **Tesis magister Sains Fakultas Pasca Sarjana UI.** Jakarta.
- Soine OT, 1964. Naturally Occuring Coumarins and Related Physiological Activities. **J of Pharm Sciences** 53 (3) : 231-261.
- Steel RGD, Torrie JH, 1980. **Principle and Procedures of Statistics : A Biometrical Approach** 2 nd. Ed New York : Mc. Graw-Hill Book Company. hal. 153-70, 233- 335.
- Sudaratana R, Theberkanoth Y, Yenjai K, Yuthavong Y, 1985. Nimbolide, a constituent of *Azadirachta indica* inhibits *P.falciparum* in culture. **Southeast Asia J. Trop. Med. Pub. Hlth.** 16(1): 66-72.
- Sudjana, 1991. **Desain dan Analisis eksperimen.** Ed.III. Bandung : Penerbit Tarsito Bandung . hal.256-262.
- Sudjadi 1988. **Metode Pemisahan** . Penerbit Kanisius Yogyakarta. hal. 167-277.
- Tan-Ariya P, Na Barychang K, 1993. Manual for in vitro sensitivity assay of *P. falciparum* to antimalarials. Simposium dan workshop "Drug resistance of *P. falciparum* . **Bag. Parasitologi FKUI Jakarta.**

- Taylor, JB & Kennewell, PD , 1993. **Modern Medicinal Chemistry**. Ellis Horwood. New York, London, Toronto . hal. 204-215; 125-134.
- Tjitrosoepomo G, 1989. **Morfologi Tumbuhan**. Cet. 5. Gadjah Mada University Press.
- Trager W, Jensen JB, 1976. Human malaria parasites in continuous culture. **Science** 193: 673-75.
- Trager W, 1979. *Plasmodium falciparum* in culture : Improved continuous flow method. **J. Protozool** 26: 129-32.
- Trager W, Jensen JB, 1978. Cultivation of malarial parasites. **Nature**. 273: 621-22.
- Trager W, 1987. The cultivation of *Plasmodium falciparum* : applications in basic applied research on malaria . **Annals of Trop Med and Parasitology** 81: 511-29.
- Trigg PI, 1976. Parasite Cultivation in relation to research on the chemotherapy of malaria **Bull of the WHO** 53: 399-406.
- Trigg PI, 1985. Recent advances in malaria parasite cultivation and their application to studies on host-parasite relationship : review. **Bull of the WHO** 63: 387-98.
- Turner RA, 1972. **Screening methods in Pharmacology**. Book I. New York, Academic Press Inc. hal. 60-63
- Usman H, Akbar PS, 1995. **Pengantar Statistika**. Bandung .Bumi Aksara. hal. 147-177.
- Van Hien HA, 1925. **Het Javaansch Receptenboek afkomstig van Soerakarta, 2 de Druk, Weltevreden** : Visser & Co. hal. 61.
- Van Steenis-Kruseman MJ, 1953 : **Select Indonesian Medicinal Plants**. Organization for Scientific Research in Indonesia. Bull . 18.
- Varga E, Szendrei K, Dinya Z, Reisch J, 1983. Aromatic Compounds from the Stalk of *Helianthus annuus*. **Fitoterapia** 55: 307-309.
- Vickery ML, Vickery B, 1981. **Secondary Plant Metabolism** London : The Macmillan Press Ltd . 171-175
- Wagner H, Wolff P, 1977. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin : Springer-Verlag. 209-210.

- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM, 1984. **Plants drug analysis A Thin Layer Chromatography Atlas** Berlin :Springer-Verlag hal. 145-160.
- Wagner H, 1985. **Pharmazeutische Biologie. 2. Drogen und ihre Inhaltsstoffe.** 3 Auflage Stuttgart-New York : Gustav Fischer Verlag. hal 242-249.
- Wernsdorfer WH, Payne D, 1988. Drug sensitivity tests in malaria parasites. In : Wernsdorfer WH & Mc Gregor I : **Malaria. Principles and practice on malariology.** Vol. II. London ; Churchill . hal 1765-1792.
- Williams DH, Fleming I, 1980. **Spectroscopic methods in organic chemistry.** Mc. Graw-Hill Book Company (UK) Limited.
- Woerdenbag HJ, Lugt CB, Pras N, 1990. *Artemisia annua*,L.: A source of novel antimalarial drugs. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition** 12. (5): 169-181.
- Woerdenbag HJ, 1993. **Adverse effect of Herbal Drugs.** Vol.2. Heidelberg, Berlin. Springer -verlag hal. 170-180.
- World Health Organization, 1977 . Research Study Group Meeting on Approaches to the Study of the Resistance of *P.falciparum* to 4-aminoquinolines and Measures to control Drug Resistant Malaria.
- World Health Organization, 1977. Summary of discussions on in-vitro cultivation of malaria parasites. **Bull of the WHO** . 55 (2-3): 411-419.
- World Health Organization, 1985 : Special Programme for Research and Training in TR. Tropical disease research TDR seventh programme report. **Malaria (2). WHO Spec programme for trop disease .** 2-13
- Wright AD, Konig GM, Angerhofer CK, Greenidge P, Linden A, Desqueyroux-Faundez R, 1996. Antimalarial Activity : The Search for Marine-Derived Natural products with Selective Antimalarial Activity: **J. Nat. Prod.** (59). 710-716.
- Wright CW, Phillipson JD, Awe SO, Kirby GC, Warhurst DC, Quetin-Leclercq, Angenot L, 1996. Antimalarial Activity of Cryptolepine and Some Other Anhydronium Bases. **Phytotherapy Res.** 10: 361-363.
- Yayon A, Friedman S, Ginsburg H, 1984. *Plasmodium falciparum*: Elimination of fungal and bacterial contamination from in vitro culture. **Annals of Trop Med and Parasitol** 78: 167-168.

LAMPIRAN

Lampiran : 1



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

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lampiran : 2.

Tabel : 2.1 Senyawa antimalaria dari tumbuhan

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

No	Nama Senyawa	Tumbuhan asal	Pustaka
1	Antranoid vismion D	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Bray, 1989
1	Khalkon uvaretin,	dan flavonoid : <i>Uvaria lucida ssp. lucida</i>	Nkunya 1991, & Phillipson 1991
2	Diuvaretin	<i>Uvaria schefferi</i>	
3	Floridsin		Phillipson 1991
4	Phillipson 1991	<i>Hypericum japonicum</i>	Mukherjee 1991
5	Kuersetin	<i>Diosma pillosa</i>	Khalid 1986
1	Terpenoid artemisinin ("qing haosu")	<i>Artemisia annua</i> L	Vennerstrom 1989, Huang 1990
2	artemisinin, 1(S)-hidroksibisa bololoksid A	<i>Artemisia apiacea</i> <i>Artemisia arbrotanum</i>	Woerdenbag 1990 Phillipson 1991
3	Partenin	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Phillipson 1991
4	"yingzhaosu"	<i>Artrabotrys uncinatus</i>	Phillipson 1991, Huang 199
5	Gosipol	<i>Thespesia populnea</i> (L) Soland ex. Correa	Mukherjee 1991 Peters 1987
6	α -siperon,	<i>Cyperus rotundus</i> L	Weenen dkk 1990
7	β -selinen		
8	bruscina A,B,C,D	<i>Brucea javanica</i>	Anderson 1991; Pavanand 1986, Guru dkk 1983, O'Neill 1987, Hamburger 1988 Anderson 1989
9	yadansiosida I		
10	Ailanton,	<i>Ailanthus altissima</i>	Bray dkk 1987
11	Ailantinon		
12	Glaukarubinon		
13	Glaukarubol		
14	Kaparin		
15	Sergeolid	<i>Picrolemma pseudocoffea</i>	Fandeur 1985
17	Eurikomanon	<i>Eurycoma longifolia</i>	Chan dkk 1986
18	Eurikomalakton Eurikomanol		
19	Gentiopikrosid	<i>Gentiana macrophylla</i>	Mukherjee, 1991
20	Nimbolid	<i>Azadirachta indica</i>	Khalid 1989
21	Nimbidin		Phillipson 1991
22	Dihidrogedunin	<i>Melia azedarach</i> , <i>Khaya se negalensis</i> , <i>Citrus aurantium</i>	
23	Gedunin		
24	Atlantin	<i>Atlantia monophylla</i>	Badam, 1988
1	Senyawa lainnya N-isobutil-deka-2,4 dienamida	<i>Zanthoxylum gillettii</i>	Weenen 1990
2	Fagaramid		
3	Swerkirin	<i>Swertia chirata</i>	Mukherjee 1991
4	β -sesalpinin	<i>Caesalpinia bonducella</i>	
5	garam Zn dari 2-mer- kaptopiridin-N-oksida	<i>Polyalthia nemoralis</i>	

*) Sumber : Broto-Sutaryo, 1994

Lampiran: 3

Daftar bahan kimia dan pereaksi yang digunakan.

Bahan kimia untuk pemeriksaan pendahuluan..

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

Pelarut untuk pembuatan ekstrak..

Eter minyak tanah teknik
Kloroform teknik
Metanol teknik

Bahan kimia untuk isolasi, pemurnian dan identifikasi.

N-heksana	Etanol
Etil asetat	Kalium bromida
Kloroform	Sodium hidroksida
Metanol	Aluminium klorida
Silika gel 60 (Merck) Art 7733	Asam klorida
Silika gel GF 254 Merck	Sodium asetat
RP 18.	
RP-WF	
Pasir laut	
Kloroform $D_2 = CDCl_3$	
Dimetilsulfoksida D_6	
Tetrametilsilan (TMS)	

Lampiran : 4

Daftar bahan kimia dan media biak untuk uji in vitro

Air suling				
Akuabides				
RPMI 1640 (Grand Island Biological), komposisi Moore terdiri atas garam anorganik, asam-asam amino, vitamin sebagai berikut (Moore, 1967) :				
Garam anorganik :		Vitamin :		
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O.	100,0	mg/L	biotin	0,20 mg/L
MgSO ₄	48,84		d-Ca pantot	0,25
NaCl	6000,0		kholin HCl	3,00
NaHCO ₃	2000,0		asam folat	1,00
Na ₂ HPO ₄	800,0		l-inositol	35,00
			nikotinamid	1,00
			para amino asam bensoat	1,00
Komponen lain			piridoksin HCl	1,00
glukosa	2000,0		riboflavin	0,20
Glutathion (reduced)	1,0		tiamin HCl	1,00
Merah fenol	5,0		vitamin B ₁₂	0,005
Asam-asam amino :				
l-arginin (basa bebas)	200,0	mg/L		
l-asparagin	50,0			
l-asam aspartat	20,0			
l-sistin	65,0	(2 HCl)		
l-asam glutamat	20,0			
l-glutamin	300,0			
glisin	10,0			
l-histidin (basa bebas)	15,0			
l-hidroksiprolin	20,0			
l-isoalusin (bebas allo)	50,0			
l-leusin (bebas metionin)	50,0			
l-lisin HCl	40,0			
l-metionin	15,0			
l-fenilalanin	15,0			
l-prolin (bebas hidroksi l-prolin)	20,0			
l-serin	30,0			
l-treonin (bebas allo)	20,0			
l-triptofan	5,0			
l-tirosin	28,94	(garam Na)		
l-valin	20,0			

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

Gentamisin sulfat

Sodium bikarbonat(dilanjutkan halaman berikutnya)

Lanjutan lampiran: 4

Daftar media biak (lanjutan)

Serum manusia (golongan O dan tidak sedang minum obat)

Darah manusia (dari PMI yang sudah kedaluwarsa)

Asam sitrat

Na sitrat

Glukosa

Adenin

Na_2HPO_4

NaH_2PO_4 .

Sorbitol

Pewarna Giemsa

Zat warna Giemsa dari Lillie (1943) terdiri dari:

Azur B eosinat 500 mg

Azur A eosinat 100 mg

Biru metilen eosinat 400 mg

Biru metilen 100 mg

Metanol p.a Aseton p.a.

Gliserol p.a Spiritus dilutus

Sodium klorida Minyak imersi

lemak silikon Lilin parafin murni.

Dapar fosfat (buffer) dengan pH 7,2 :

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

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

Larutan Giemsa siap pakai (dibuat baru):

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

Larutan C.P.D. steril :

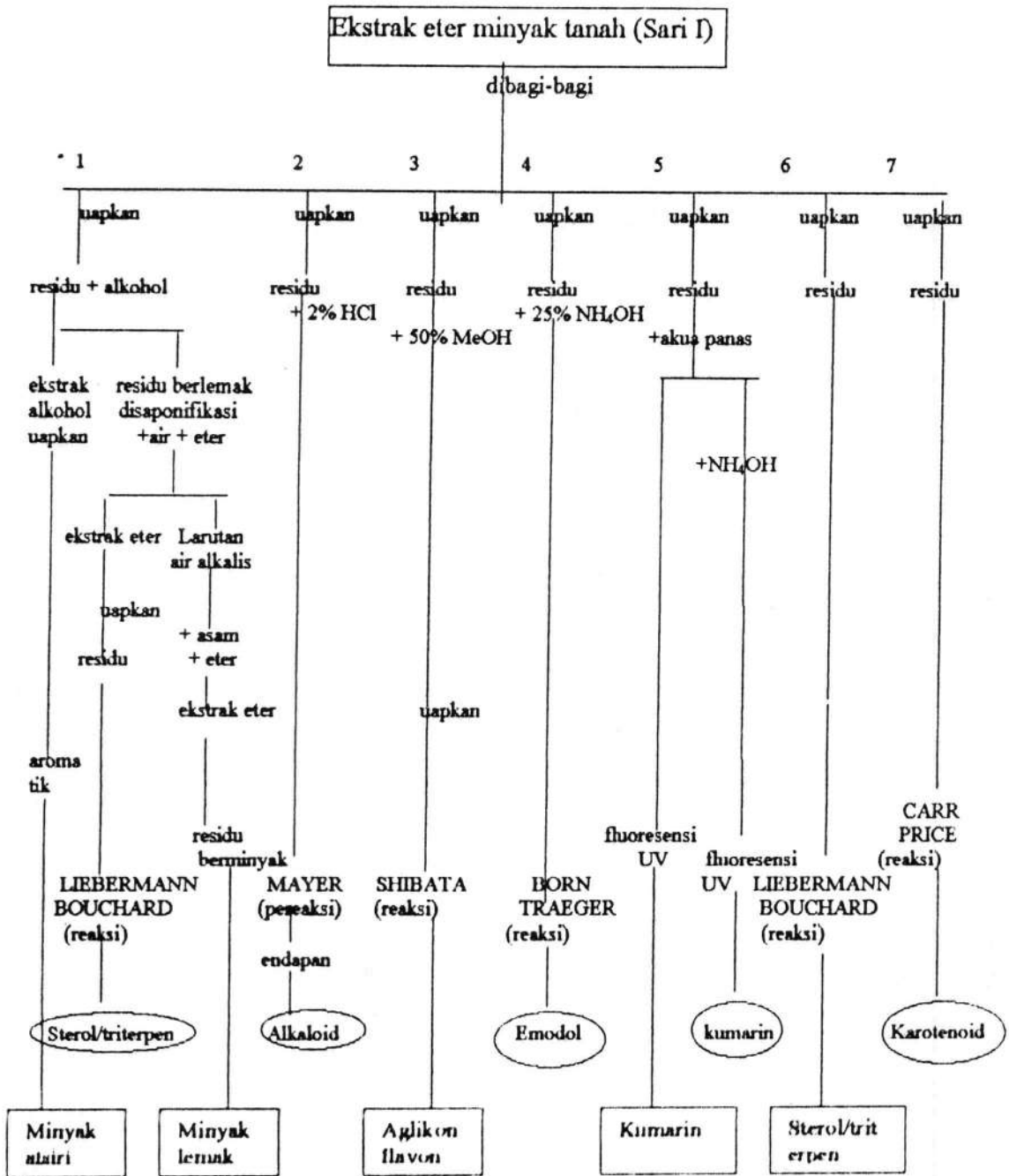
Asam sitrat sebanyak 0,327 g, sodium sitrat sebanyak 2,63 g glukosa sebanyak 2,55 g dan bisodium fosfat sebanyak 0,222 g dilarutkan ke dalam air suling menjadi 100 mL. Disterilisasi dalam autoklaf suhu 110° C selama 15 menit.

Lampiran : 5.**Daftar alat -alat yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria:**

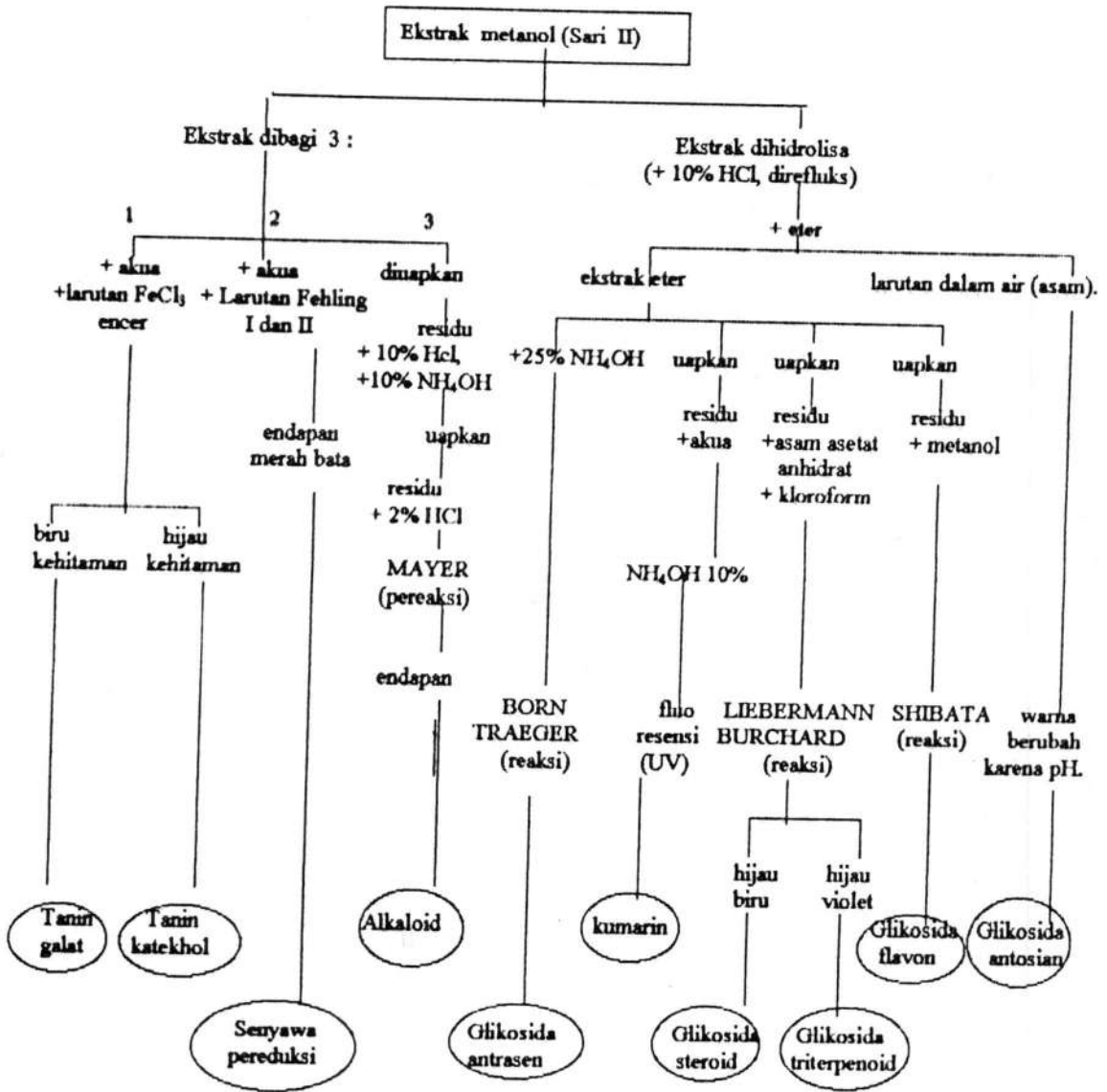
Mikroskop dan perlengkapannya
Laminar air flow cabinet
Inkubator
Timbangan analitik
Timbangan gram
Penangas air
Penangas listrik
Alat rotavapor
Oven
Autoklaf
Lemari pendingin
Desikator dengan keran pada tutupnya
Saringan milipor diameter pori 0.22 μm dan 0.45 μm
Mikroskop binokuler
Alat sentrifuga
Tabung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

Lampiran : 6.

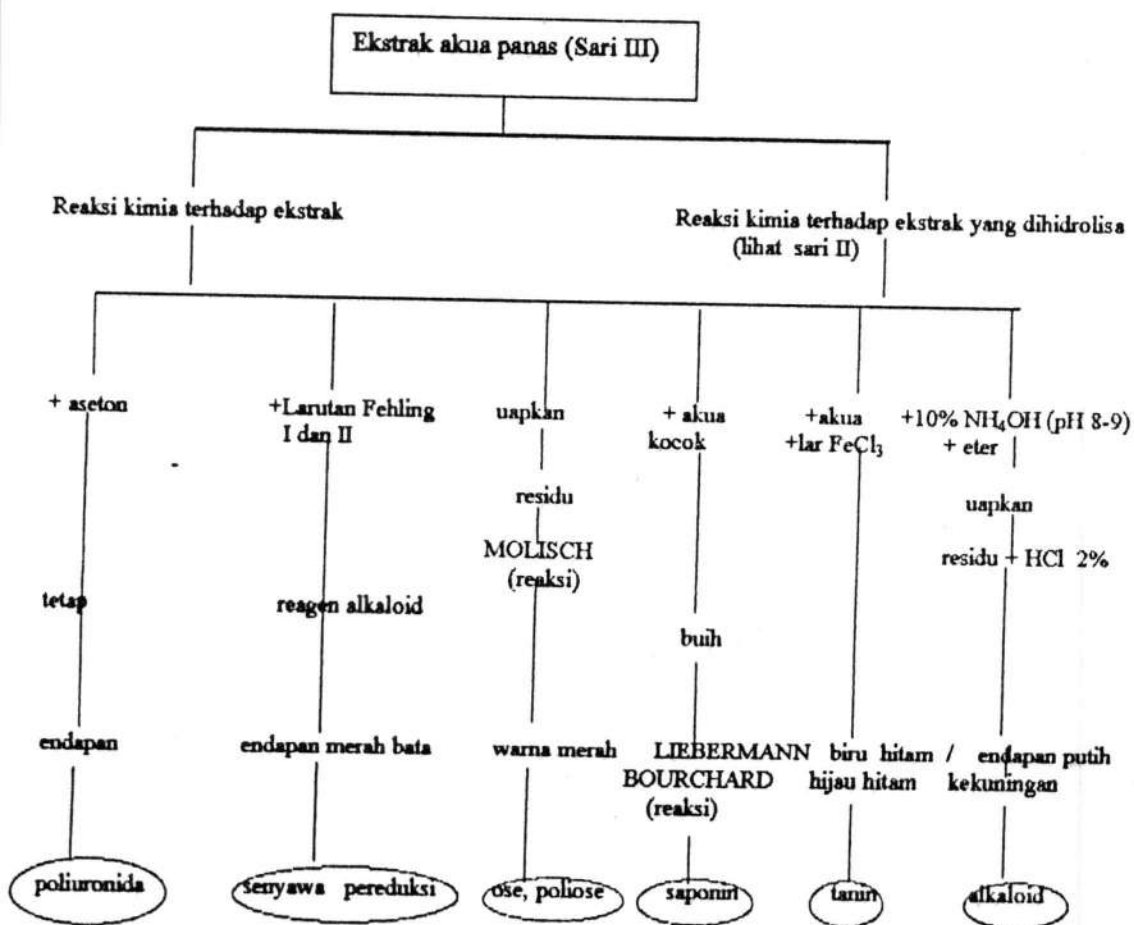
Bagan Proses identifikasi kandungan *E. triplinerve* adalah sebagai berikut:



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



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



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

Keterangan :

Reaksi Liebermann-Burchard :

Dalam tabung reaksi, sari yang diteliti diuapkan sampai kering,, sisa dilarutkan ke dalam asam asetat anhidrat dan kloroform. Melalui dinding tabung dialirkan asam sulfat pekat. Jika diantara ke dua cairan terbentuk cincin berwarna ungu atau merah coklat dan larutan bagian atas hijau atau ungu, menunjukkan adanya steroid atau triterpenoid.

Reaksi Shibata :

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

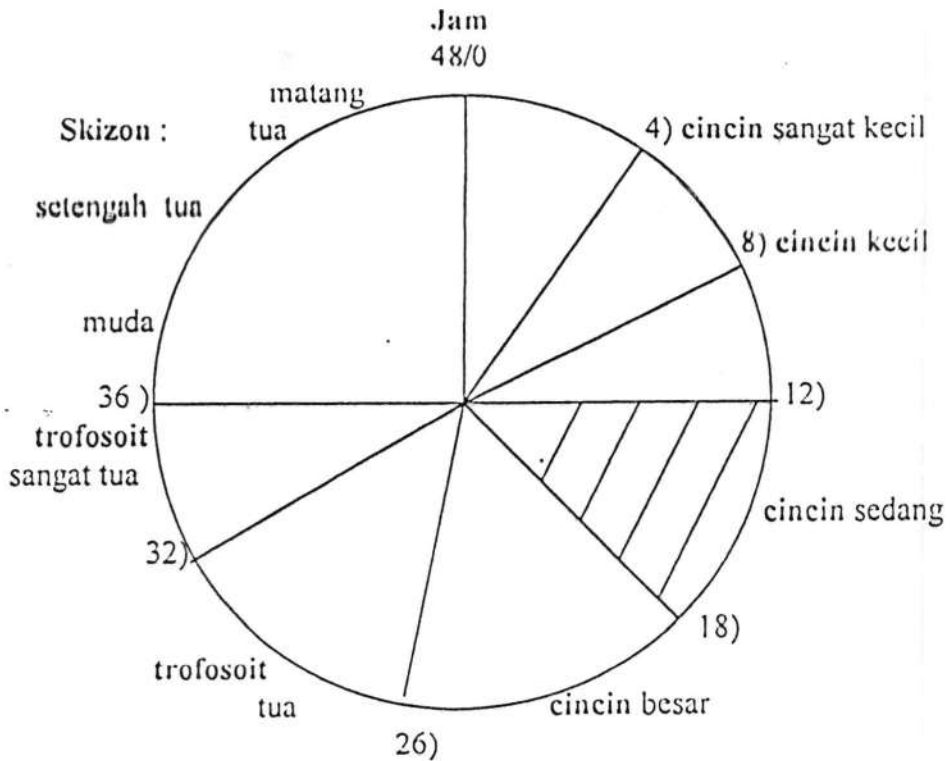
Reaksi Borntraeger:

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

Reaksi Carr-Price :

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

Lampiran : 7.



Keterangan : daerah bergaris menunjukkan daerah setelah plasmodium mengalami dua kali sinkronisasi (umur antara 12 sampai 18 jam).
(Sumber : WHO: 1977)

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

Hasil determinasi *Eupatorium triplinerve* Vahl.

Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

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

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

No. 25/5.4/Bot/II/1992.

Bogor, 20 Februari 1992

Kepada Yth.

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

Dengan Hormat,

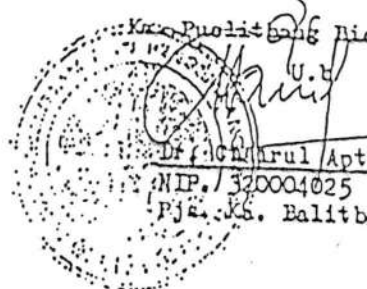
Menunjuk surat Saudara tertanggal - 13 Desember 1991.

No. -254/Skt/K/FF/21/91. dengan ini diberitahukan bahwa tumbuhan yang Saudara kirimkan ke Herbarium Bogoriense, Balitbang Botani, Puslitbang Biologi - LIPI, Bogor, adalah sebagai berikut :

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

Demikian, semoga berguna bagi saudara.

Kep. Puslitbang Biologi - LIPI
U. B.
Dr. Achmad Apt
NIP. 320004025
Pj. Ks. Balitbang Botani



Lampiran : 9.

Perhitungan statistik dari kontrol negatif .

Perhitungan uji t dari kontrol negatif I (K-1) dan kontrol negatif II (K-2) :
(Budianto , 1989; Usman dkk 1995).

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

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

Keterangan :

K(-1) = kontrol negatif 1 tanpa pemberian 0.1% DMSO

K(-2) = kontrol negatif 2 dengan penambahan 0.1% DMSO.

Menentukan Ho dan Ha :

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

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

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

dimana :

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

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

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

Jadi t hitung < t tabel maka Ho diterima.

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

Lampiran :10

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

Tabel : 5.4.
Persen penghambatan bermacam-macam ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* in vitro.

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

Keterangan :

K = kadar bahan uji

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

K1 = 10.000 μ g/mL

K4 = 10 μ g/mL

K2 = 1.000 μ g/mL

K5 = 1 μ g/mL

K3 = 100 μ g/mL

K6 = 0,1 μ g/mL

Analisis data.

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

Dari kurva tersebut dapat diperhitungkan IC_{50} , yaitu kadar dimana persen penghambatan pertumbuhan skizon sebesar 50%.

Lanjutan lampiran :10

Tabel : 5.5.

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

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

Persamaan garis regresi $Y = a + bX$

$X = \text{Log kadar}$

$Y = \text{Probit}$

Pada IC_{50} maka probit $Y = 5.0$.

Tabel : 5.6.

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

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

Lampiran :11.

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

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

Tabel : 5.7.

Data transformasi penghambatan (Y) ke dalam bentuk $\log(Y+1)$ dari ekstrak daun *E. triplinerve*.

Ekstrak	Pengu- langan	Y/ Log(Y+1)	K(+2)	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Eter minyak tanah	1	Y	100	100	100	99	75	61	18
		Log(Y+1)	2,00	2,00	2,00	2,00	1,88	1,79	1,28
	2	Y	100	100	100	84	62	53	16
		Log(Y+1)	2,00	2,00	2,00	1,93	1,80	1,73	1,23
	3	Y	100	100	94	77	71	34	12
	Log(Y+1)	2,00	2,00	1,98	1,90	1,86	1,54	1,11	
	Rata2 SD (\pm)	Log(Y+1)	2,00 0	2,00 0	1,99 0,03	1,94 0,05	1,85 0,04	1,69 0,13	1,21 0,09
Kloro- form	1	Y	100	100	92	43	29	11	15
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,97	1,64	1,48	1,08	1,20
	2	Y	100	100	94	56	22	15	7
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,98	1,76	1,36	1,20	0,90
	3	Y	100	100	87	66	36	18	12
	Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,82	1,57	1,28	1,11	
	Rata2 SD (\pm)	Log(Y+1)	2,00 0	2,00 0	1,96 0,02	1,74 0,09	1,47 0,11	1,18 0,10	1,07 0,15
Metan ol	1	Y	100	100	87	54	32	8	7
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,74	1,52	0,95	0,90
	2	Y	100	100	86	43	25	4	3
		Log(Y+1)	2,00	2,00	1,94	1,64	1,41	0,70	0,60
	3	Y	100	100	84	43	36	3	4
	Log(Y+1)	2,00	2,00	1,93	1,64	1,57	0,60	0,70	
	Rata2 SD (\pm)	Log(Y+1)	2,00 0	2,00 0	1,94 0,01	1,67 0,06	1,50 0,08	0,75 0,18	0,73 0,15

Keterangan :

Y = persen penghambatan

K+ = klorokuin 4 pMol/50 uL = 0,03 $\mu\text{g/mL}$

K1 = 10.000 $\mu\text{g/mL}$

K4 = 10 $\mu\text{g/mL}$

K2 = 1.000 $\mu\text{g/mL}$

K5 = 1 $\mu\text{g/mL}$

K3 = 100 $\mu\text{g/mL}$

K6 = 0,1 $\mu\text{g/mL}$

Lanjutan lampiran : 11.

Tabel : 5.8
Rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda.

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

Keterangan :

 $Y_{ij} = \text{Log}(Y + 1) = \text{Log. persen penghambatan}$ K+ = klorokuin 4 pMol/50 uL = 0,03 $\mu\text{g/mL}$ K1 = 10.000 $\mu\text{g/mL}$ K4 = 10 $\mu\text{g/mL}$ K2 = 1.000 $\mu\text{g/mL}$ K5 = 1 $\mu\text{g/mL}$ K3 = 100 $\mu\text{g/mL}$ K6 = 0,1 $\mu\text{g/mL}$

Lanjutan lampiran : 11

Menentukan H_0 dan H_a :

H_{01} = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap ekstrak daun *E. triplinerve*. terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

H_{02} = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dalam setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve*. terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

H_{a1} = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve*. terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

H_{a2} = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dalam setiap ekstrak dari daun *E. triplinerve*. terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

Perhitungan ANAVA untuk rancangan tersetarung dengan jumlah anak kelas berbeda.

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

s = replikasi = pengulangan = 3

r = kelompok kadar dalam tiap perlakuan

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lanjutan lampiran : 11.

Tabel : 5.9.

Tabel ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah subsampling yang berbeda.

Sumber variasi	df	SS	MS
Antar kelompok (kadar)	$(L - 1) = 19 - 1 = 18$	SS = 10,3595	
Antar perlakuan (jenis fraksi)	$(i - 1) = 4 - 1 = 3$	SSA = 2,3358	MSA = $SSA : (i - 1) = 2,34 : 3 = 0,78$
Antar kelompok dalam perlakuan (Exp. error)	$(L - 1) - (i - 1) = (L - i) = 19 - 4 = 15$	SS kelompok = SSB 10,0605	MSB = $SSB : (L - 1) = 10,06 : 15 = 0,67$
Antar sumur dalam kelompok (Sampling error)	$(N - 1) - (L - 1) = (N - L) = 57 - 19 = 38$	SSE = 0,2995	MSE = $SSE : (N - 1) = 0,2995 : 38 = 0,007$
Total	$(N - 1) = 57 - 1 = 56$		

Dari tabel di atas dapat diperoleh harga F hitung :

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

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

Perbandingan harga F hitung dengan F tabel:

$$F \text{ tabel } 1 = \alpha, (i-1), (L-1). \\ \alpha = 0,05 ; df = 3 \text{ dan } 15$$

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

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

$$F \text{ tabel } 2 = \alpha, (i-1), (N-1). \\ \alpha = 0,05 ; df = 15 \text{ dan } 38$$

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

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

Kesimpulan.

F hitung 1 > F tabel 1, maka H_0 ditolak dan H_a diterima

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

F hitung 2 > F tabel 2, maka H_0 ditolak dan H_a diterima

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

Lampiran : 12.

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

Tabel : 5.12

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

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

Persamaan garis regresi $Y = a + bX$

X = Log kadar

Y = Probit

Pada IC_{50} maka probit $Y = 5.0$.

Tabel : 5.13

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

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

Lampiran : 13.

Analisis varian (ANOVA).

Tabel : 5.14.
Rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda dari isolat ekstrak daun E. triplinerve.

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

Keterangan :

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

Lanjutan lampiran : 13.

Menentukan H_0 dan H_a

H_{01} = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

H_{02} = Tidak ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dari setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*

H_{a1} = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*.

H_{a2} = Ada perbedaan pengaruh secara bermakna yang ditimbulkan oleh adanya perbedaan kadar dari setiap isolat ekstrak daun *E. triplinerve* terhadap pertumbuhan *P. falciparum in vitro*

Perhitungan ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah anak kelas berbeda.

N = jumlah percobaan = $3 \times 1 + 3 \times 5 + 3 \times 5 + 3 \times 5 = 48$

S = replikasi = pengulangan = 3

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

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

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

SS kadar = $(\sum Y_{ij}^2 : s) - C = (36 + 140,77 + 125,15 + 70,86) : 3 - C = 124,26 - 116,252 = 8,008$

$df = (L-1) = 15$

SS perlakuan (treatment) (SSA) = $(Y_i^2 : sr) - C = (6^2 : 3 + 26,40^2 : 15 + 24,10^2 : 15 + 18,20^2 : 15) - 116,252 = 3,011$

$df = (i-1) = 2$

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

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

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

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

Tabel : 5.15

Tabel ANAVA untuk rancangan tersarang dengan jumlah subsampling yang berbeda.

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

Lanjutan lampiran 13.

Dari tabel di atas diperoleh F hitung :

F hitung 1 = MSA : MSE = 1,5005 : 0,0334 = 44,93 (df = 2; 13)

F hitung 2 = MSB : MSE = 0,3844 : 0,0334 = 11,509 (df: 13; 33)

F tabel 1 = 2,920; 1,771

F tabel 2 = 1,771; 1,690

Jadi :

F hitung1 > F tabel 1 maka : Ho₁ ditolak dan Ha₁ diterima

F hitung 2 > F tabel 2 maka : Ho₂ ditolak dan Ha₂ diterima.

Berarti :

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

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

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

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

Tabel : 5.16

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

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

Keterangan :

Y11 = harga rata-rata kontrol positif

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

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

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

Hasil :

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

kontrol positif) adalah :

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

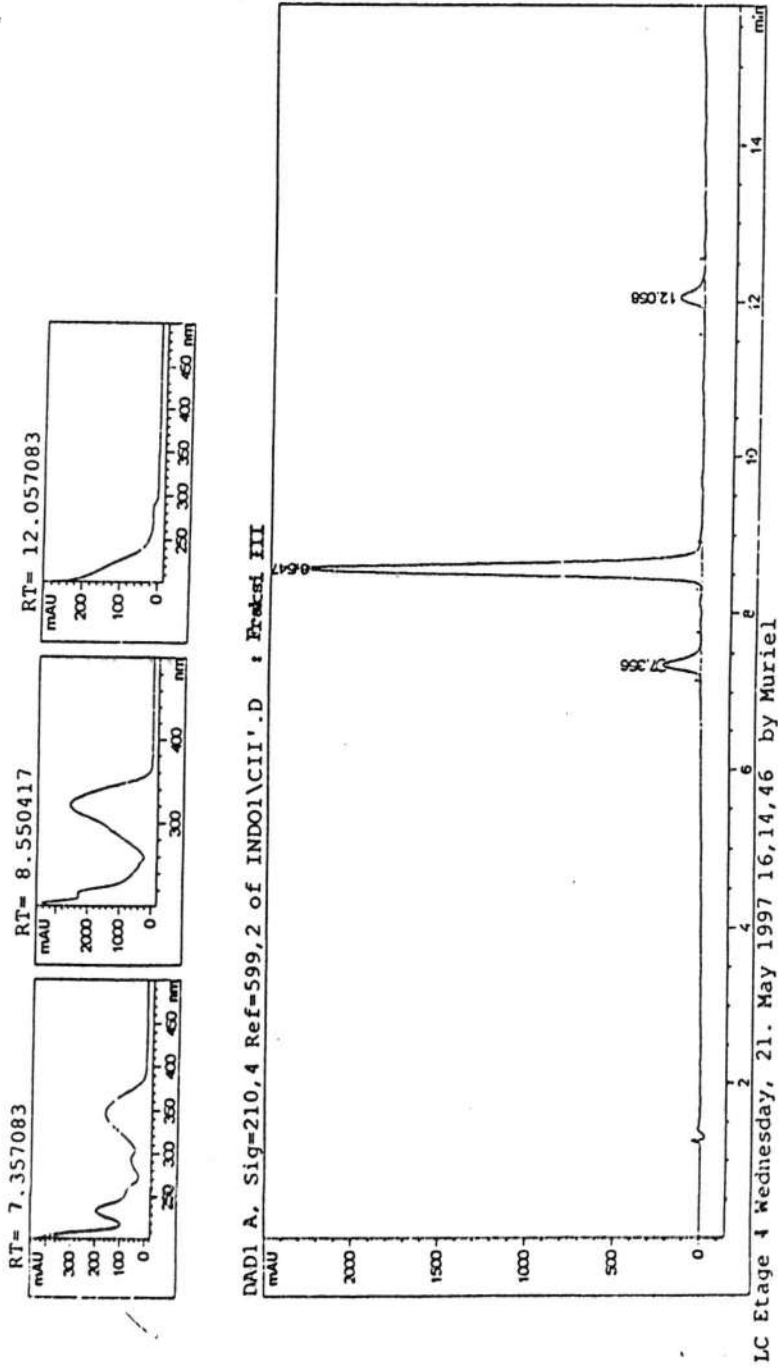
Isolat II dengan kadar $\geq 12,5 \mu\text{g/mL}$

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



Lampiran : 14 a.

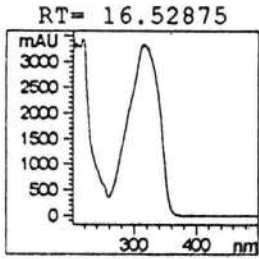
Hasil pengukuran KCKT isolat II



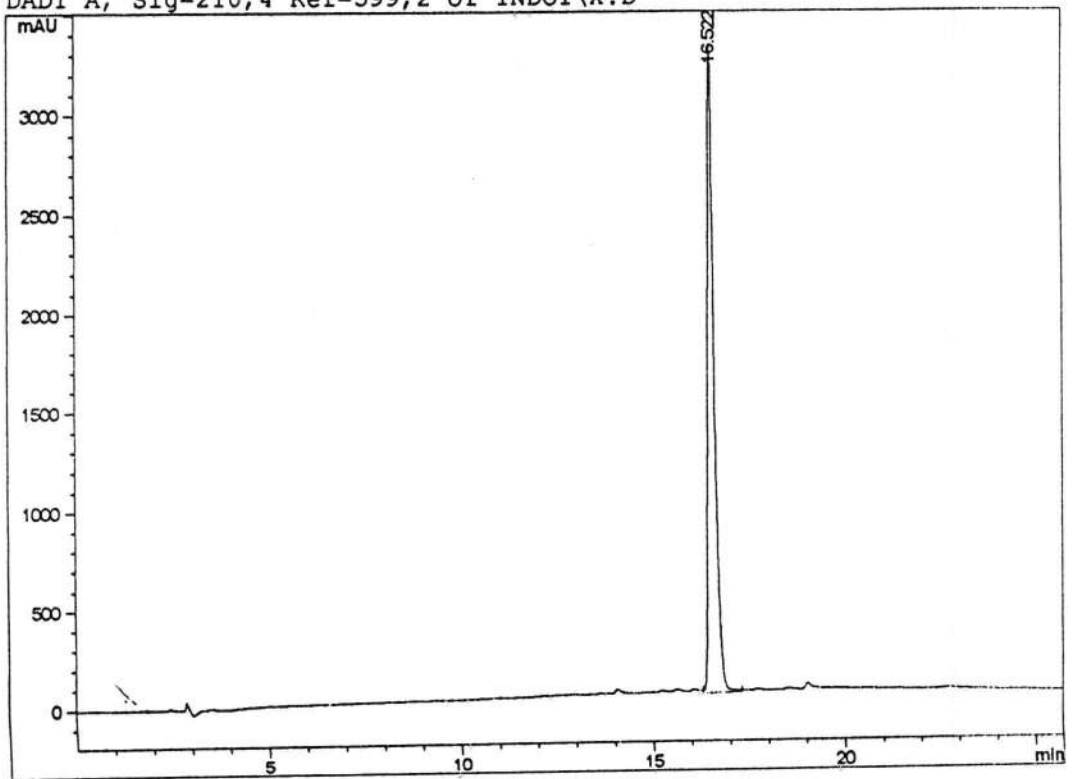
LC Etage 4 Wednesday, 21. May 1997 16,14,46 by Muriel

Lampiran : 14 b.

Hasil Pengukuran isolat II setelah pemurnian dengan MPLC



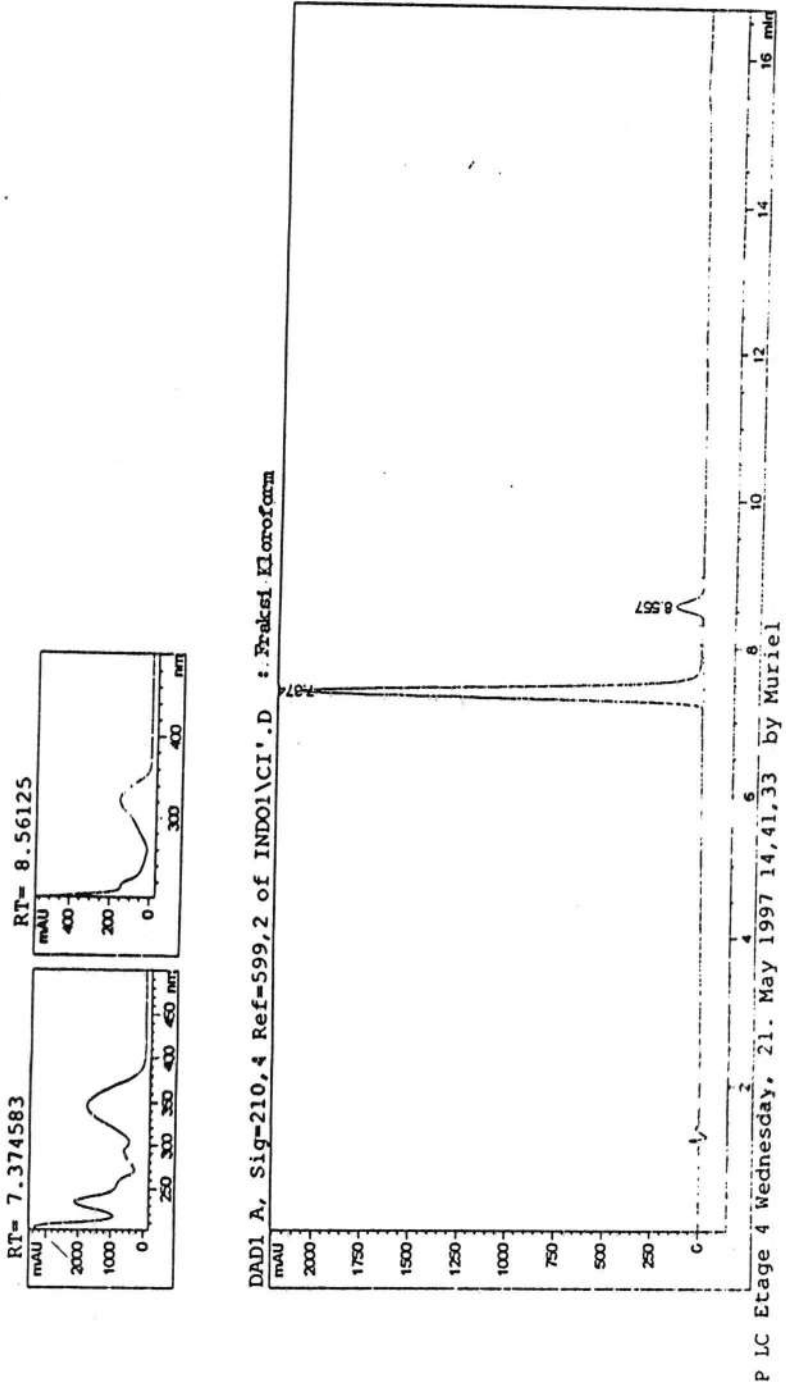
DAD1 A, Sig=210,4 Ref=599,2 of INDO1\X.D



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

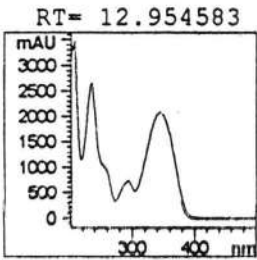
Lampiran : 14 c.

Hasil Pengukuran KCKT Isolat III

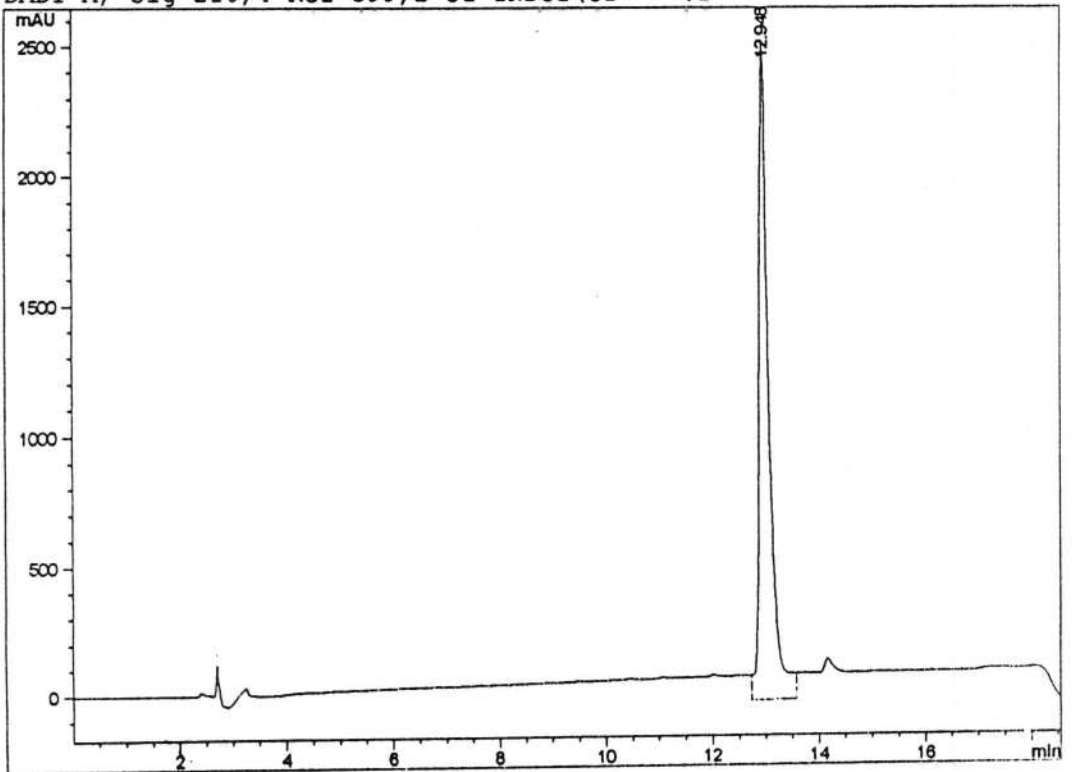


Lampiran : 14 d.

Hasil pengukuran KCKT isolat III setelah MPLC.



DAD1 A, Sig=210,4 Ref=599,2 of INDO1\C1'''.D



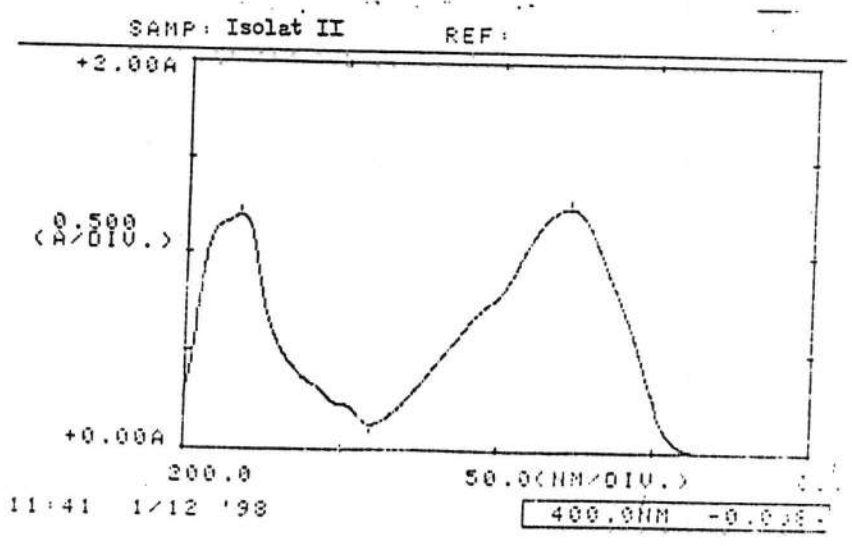
HP LC Etage 4 Tuesday, 24. June 1997 10,42,42 by Muriel

Lampiran : 15.

Spektrum ultraviolet isolat II dan isolat III.

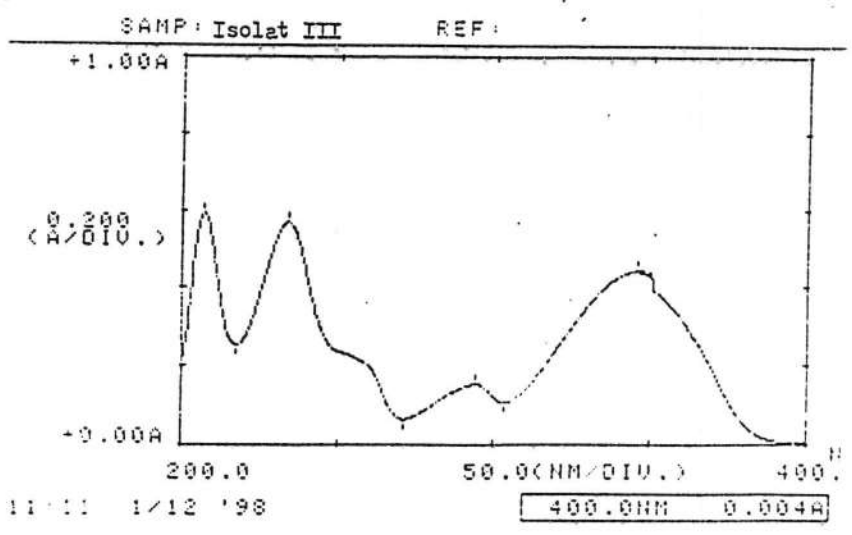
--- PEAK ---
 --- VALLEY ---

λ	ABS	λ	ABS
387.0	1.250	259.4	0.127
216.8	1.202		



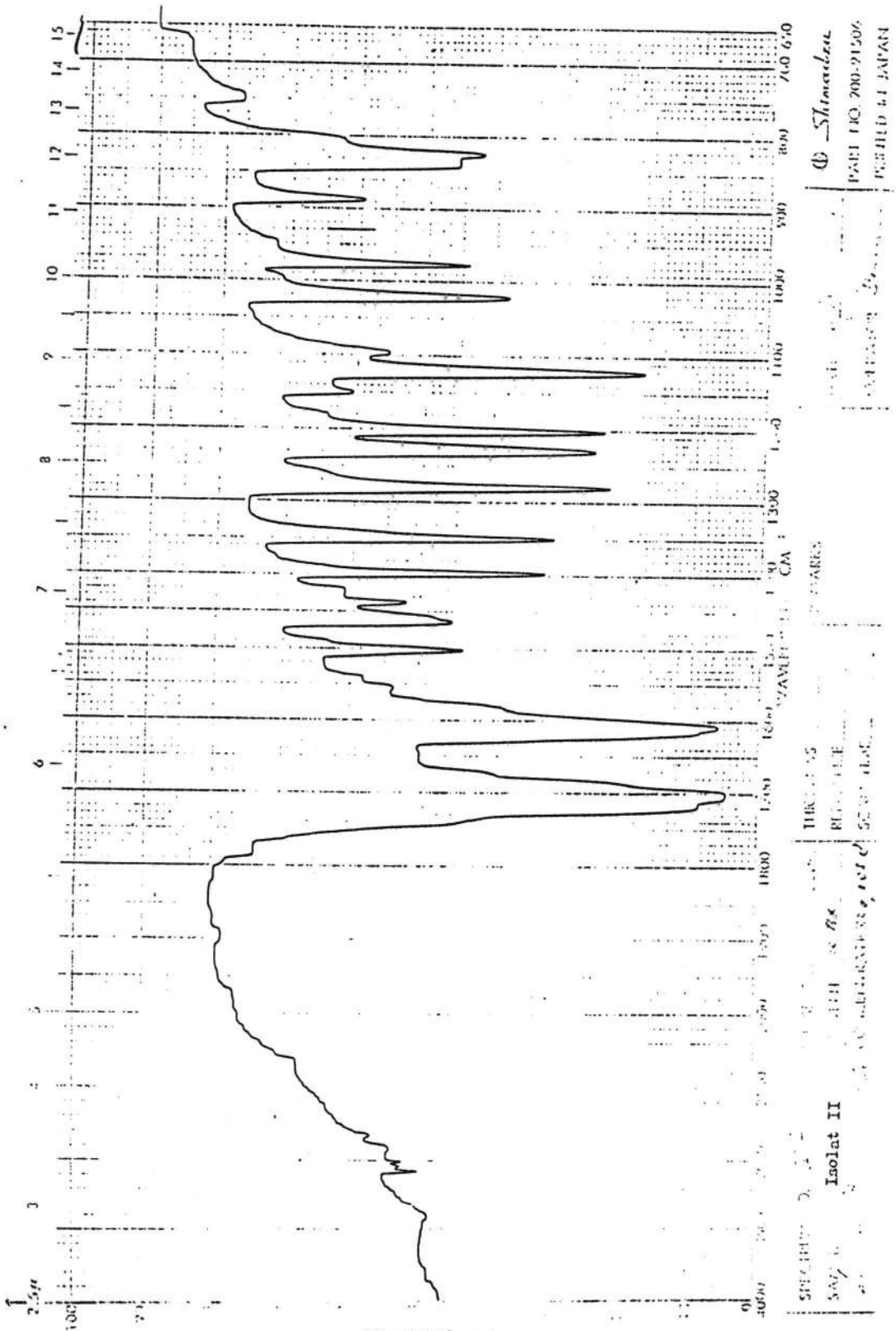
--- PEAK ---
 --- VALLEY ---

λ	ABS	λ	ABS
345.6	0.447	303.0	0.106
294.0	0.155	271.2	0.065
234.0	0.569	217.6	0.251
207.2	0.596		



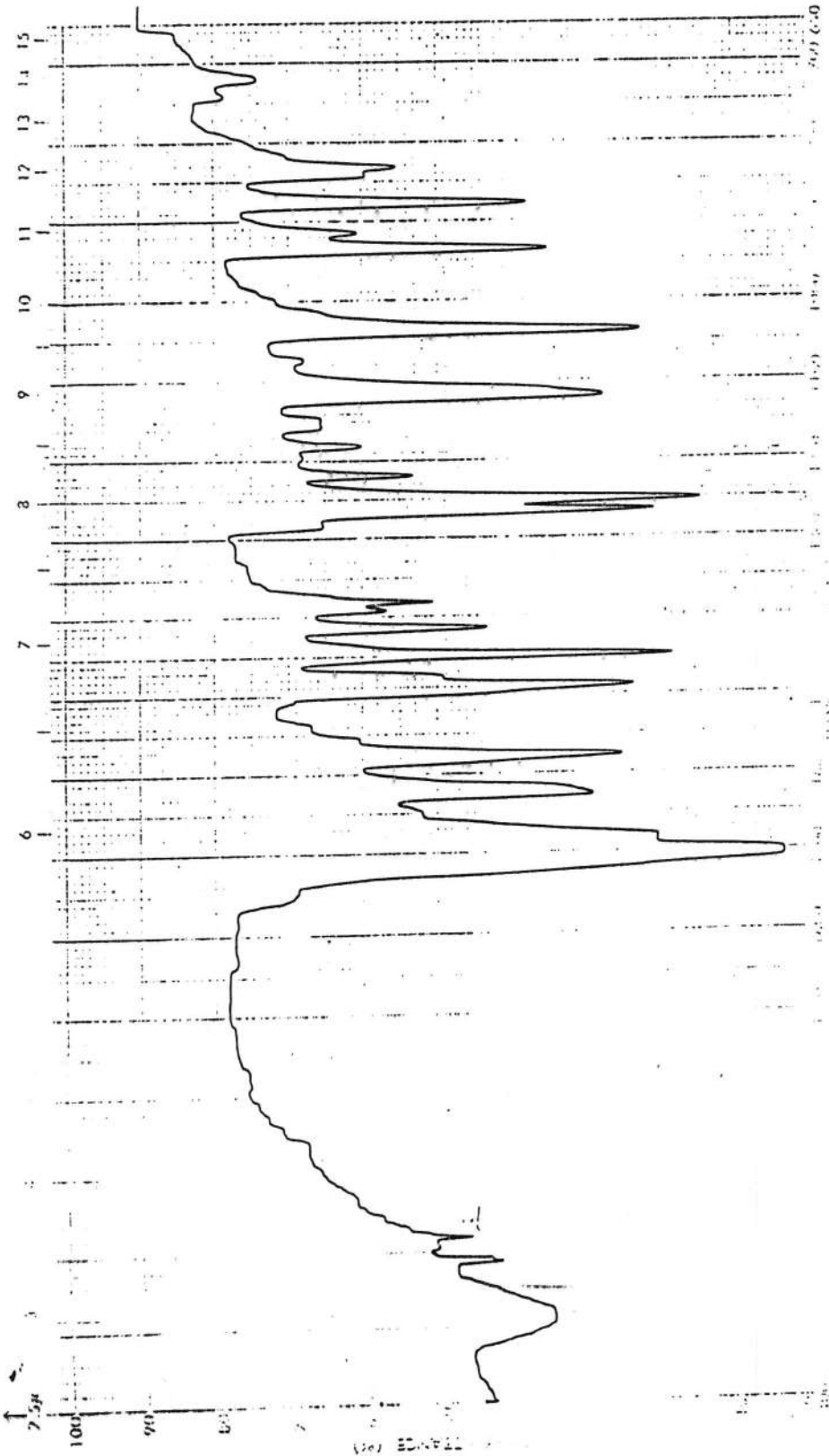
Lampiran : 16

Spektrum infra merah isolat II



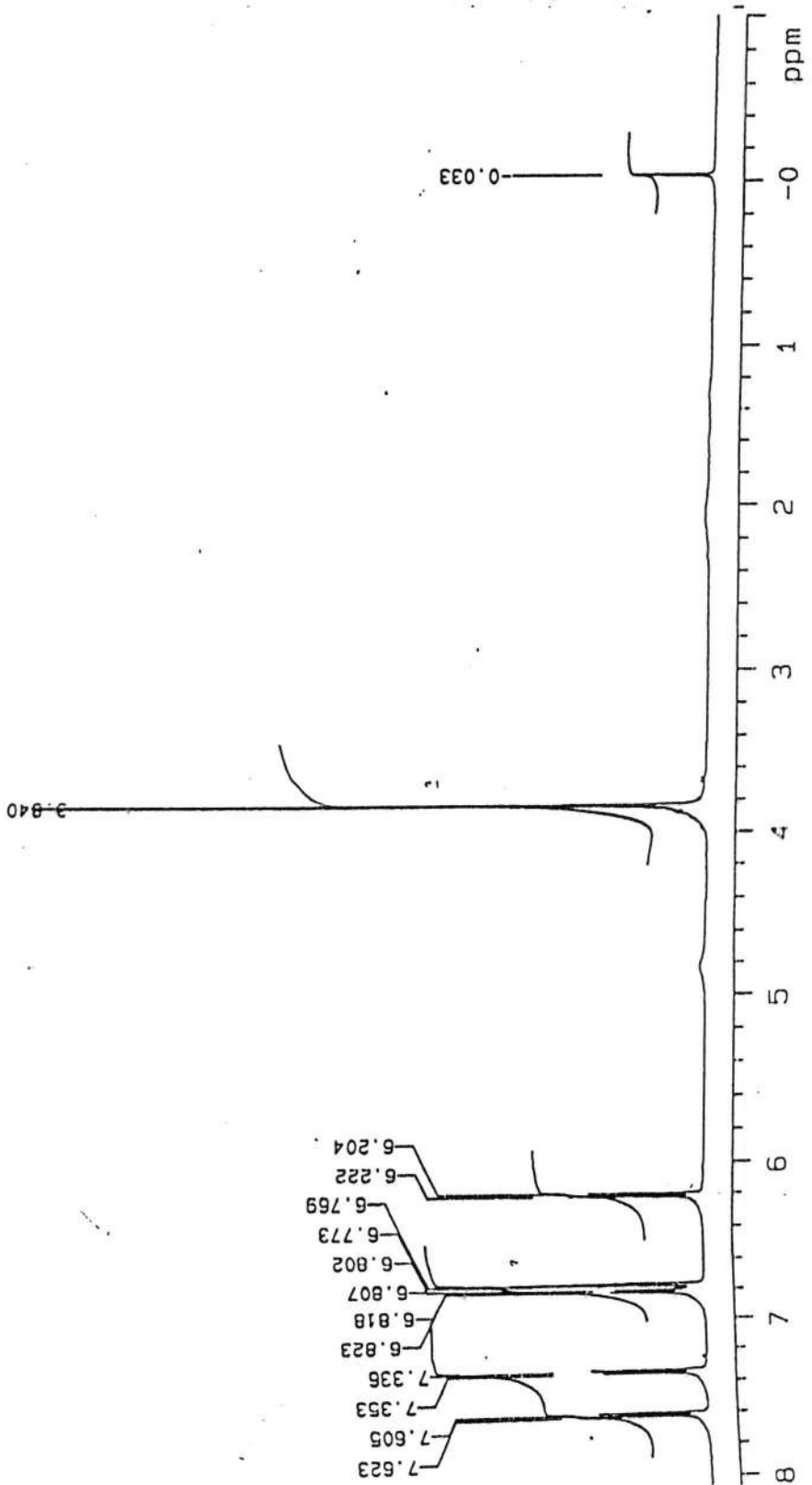
Lampiran : 17.

Spektrum infra merah isolat III

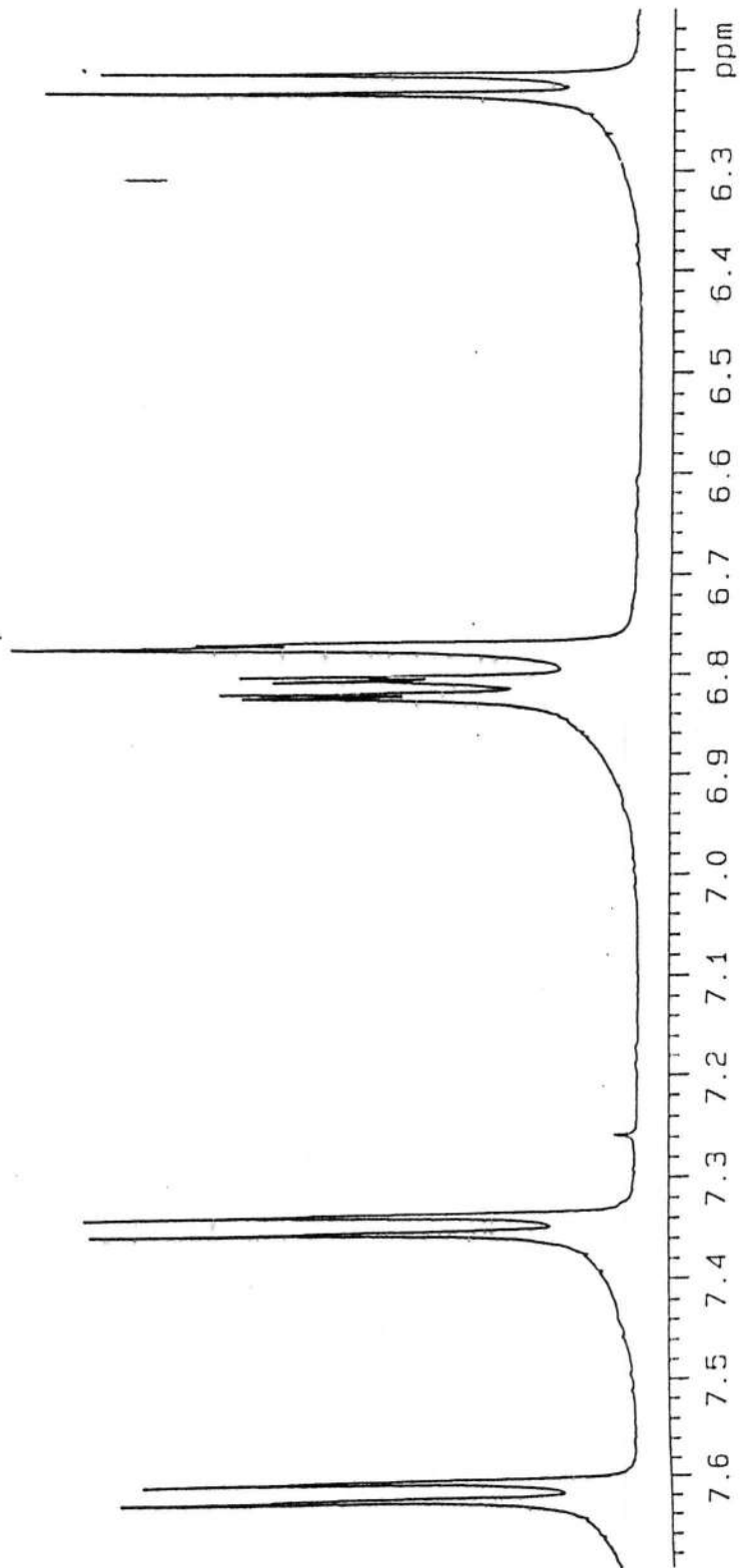


SECURITY
SAMPLE
Isolat III
G. S. Masroera
No. 31/194/1966
P. 11. B. 1964

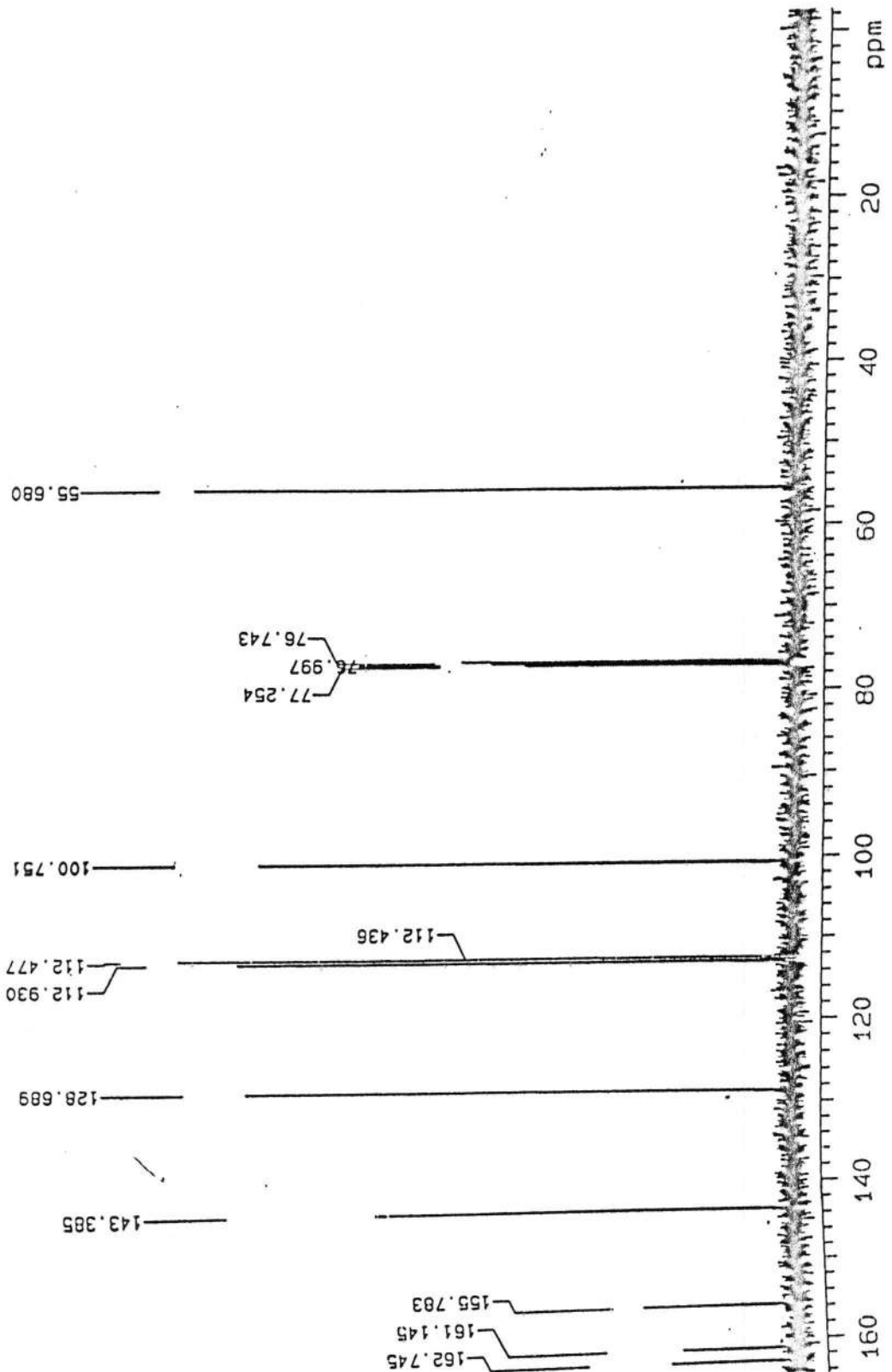
Lampiran : 18 a.

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

Lampiran : 18 b.

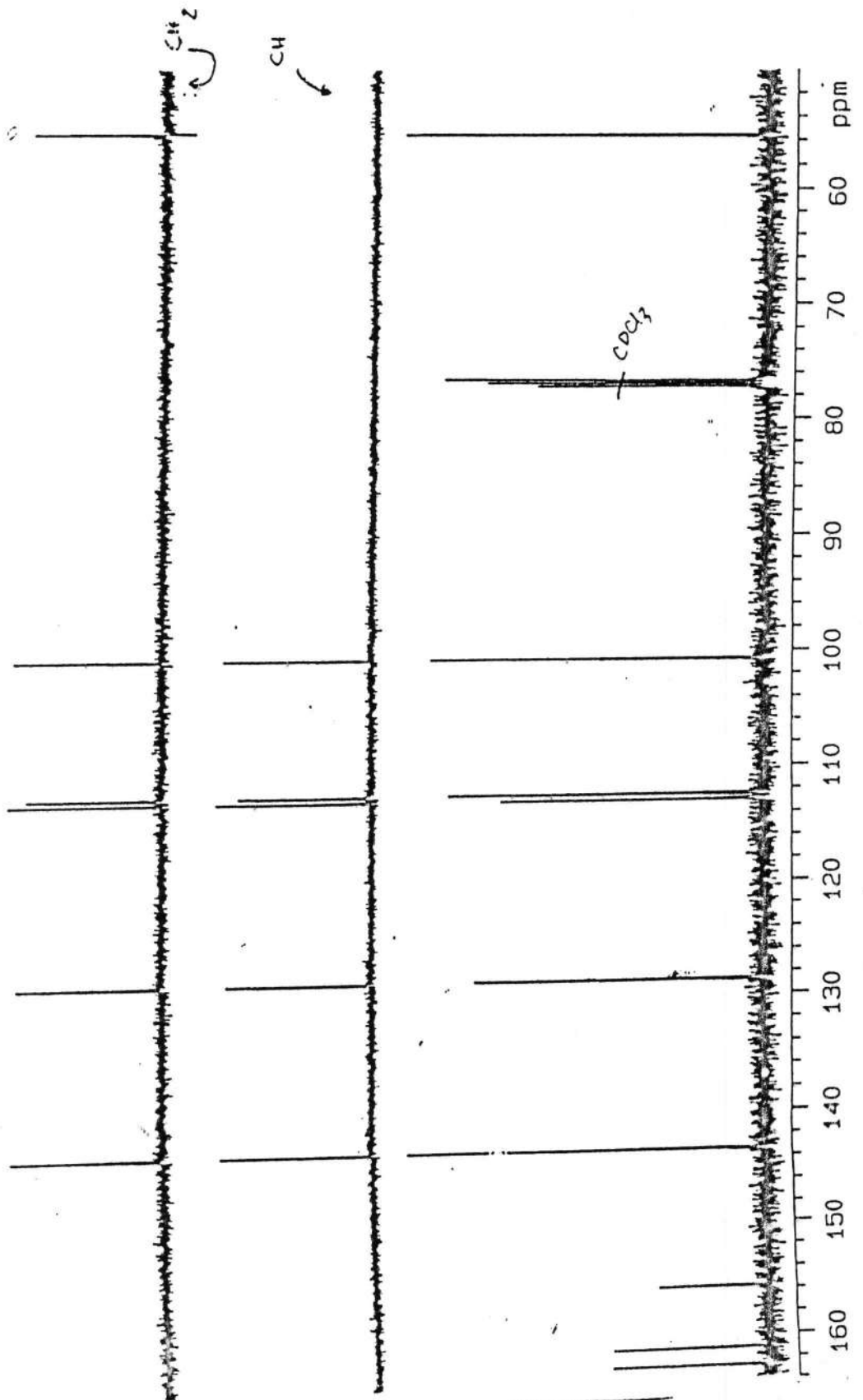
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) dalam CDCl_3 26.0 C/299.1 K dari isolat II

Lampiran : 18 c.

Spektrum ^{13}C -RMI (500 MHz) dalam CDCl_3 26.0 C/299.1 K dari isolat II

Lampiran : 18 d.

Spektrum DEPT dari Isolat II



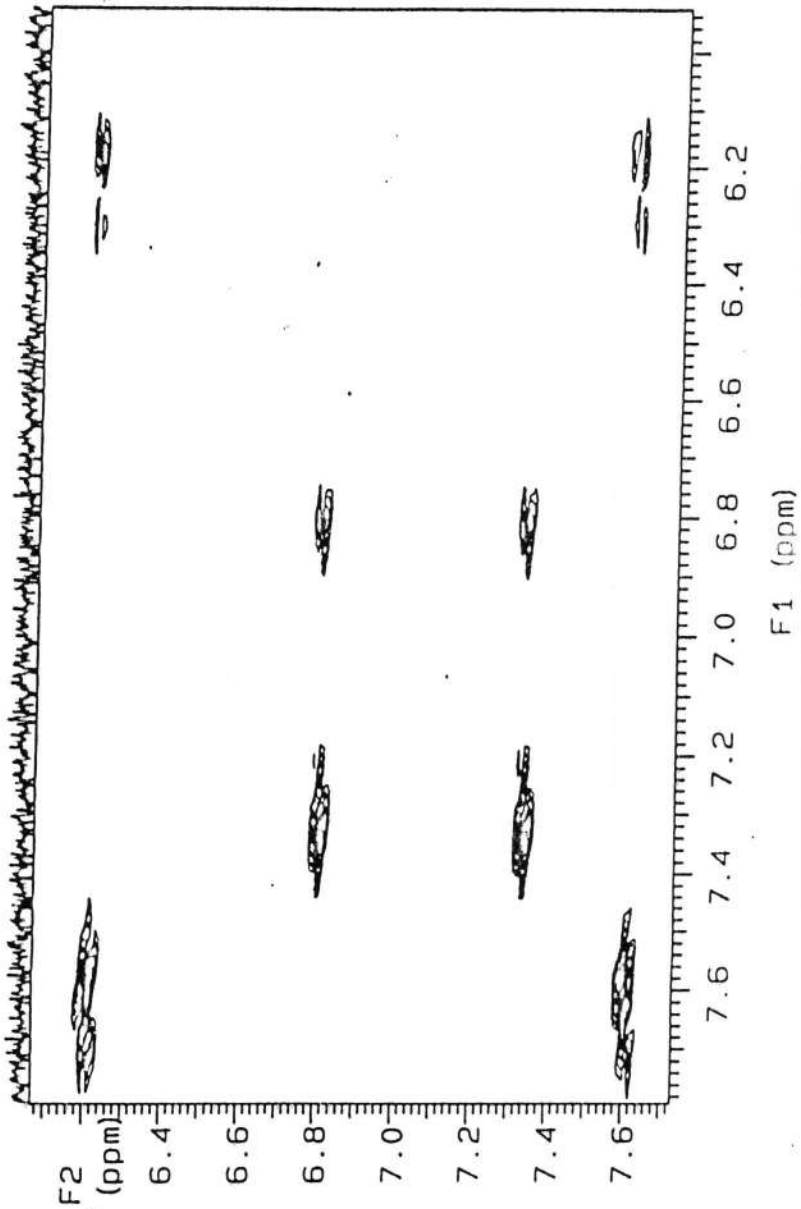
Lampiran : 18 e.

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

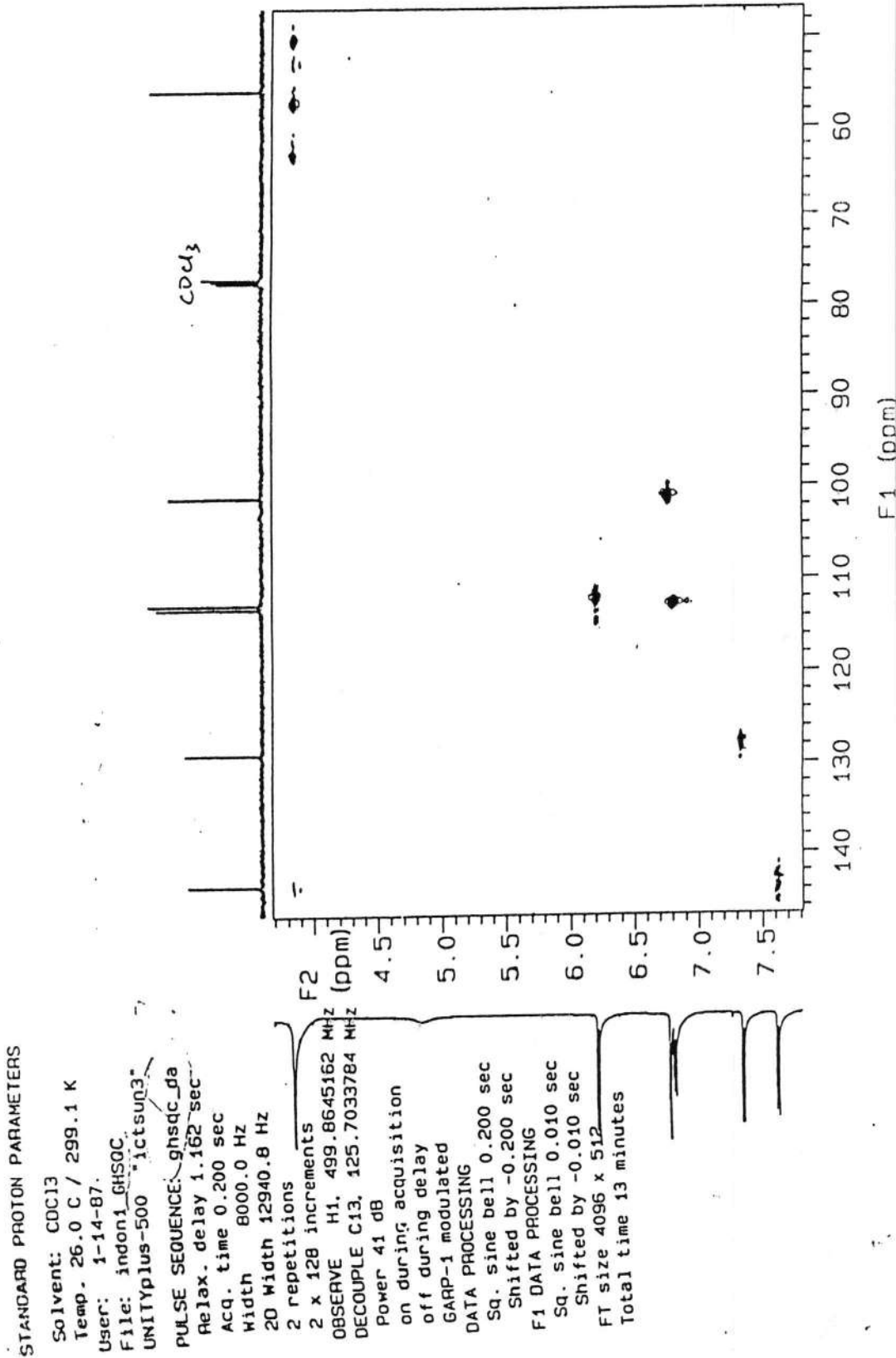
STANDARD PROTON PARAMETERS

Solvent: CDCl_3
 Temp. 26.0 C / 299.1 K
 User: 1-14-87
 File: indoni_gdqcosy
 UNITYplus-500 "ictsun3"

SEQUENCE: gmqfcops_da
 Relax. delay 1.500 sec
 Acq. time 0.128 sec
 Width 8000.0 Hz
 20 Width 8000.0 Hz
 Single scan
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 499.8643102 MHz
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.128 sec
 Shifted by -0.128 sec
 :1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.016 sec
 Shifted by -0.016 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 6 minutes



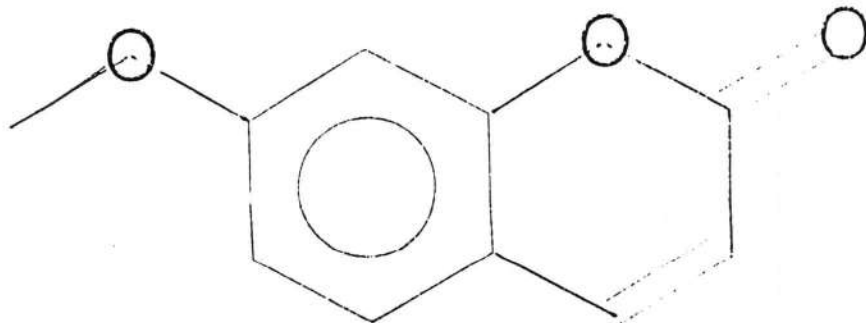
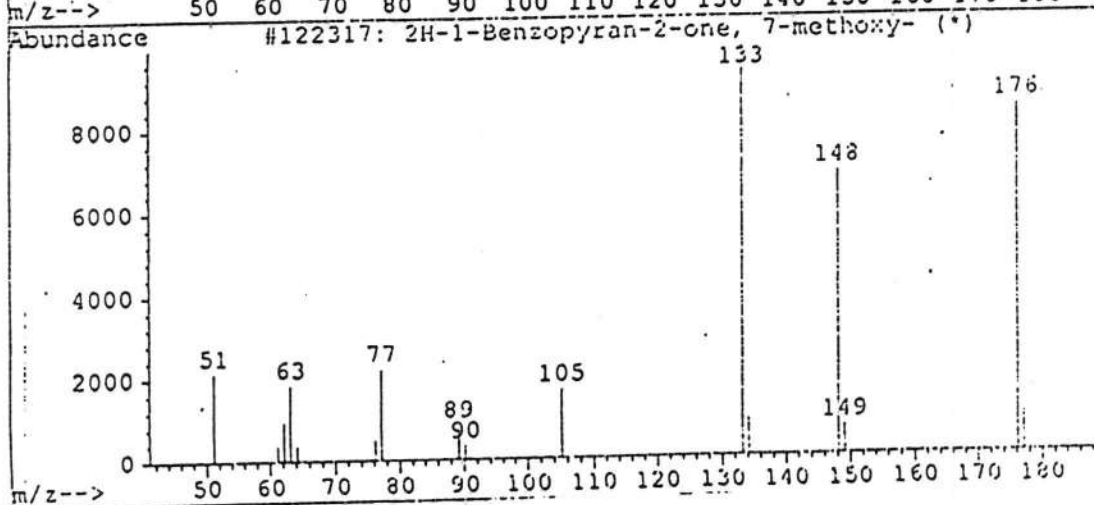
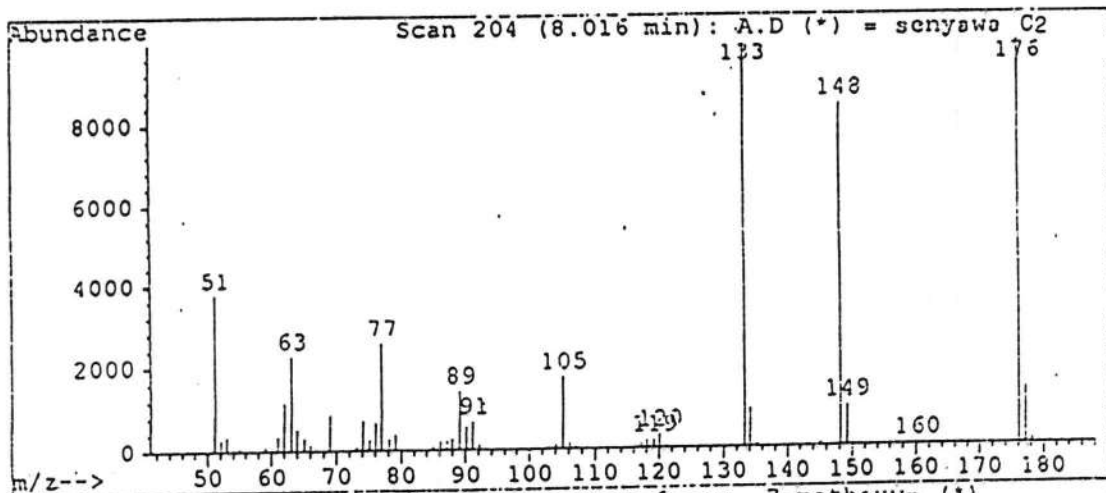
Lampiran : 18 f.

Spektrum ^{13}C - ^1H cosy dari isolat II.

Lampiran : 19.

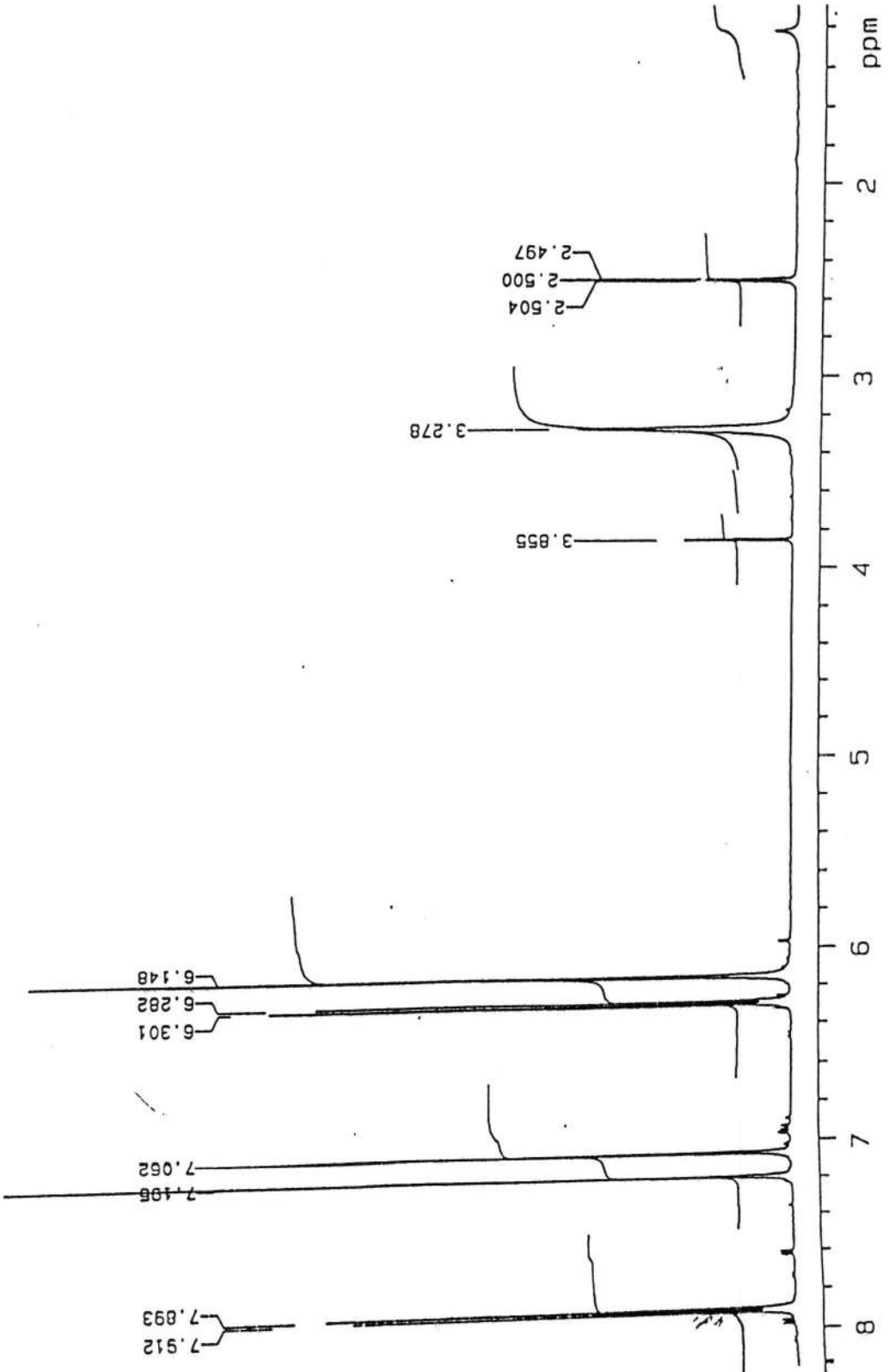
Spektrum massa dari isolat II dibandingkan dengan spektrum massa dari 7-metoksi 2H-1-benzopiran-2-on.

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



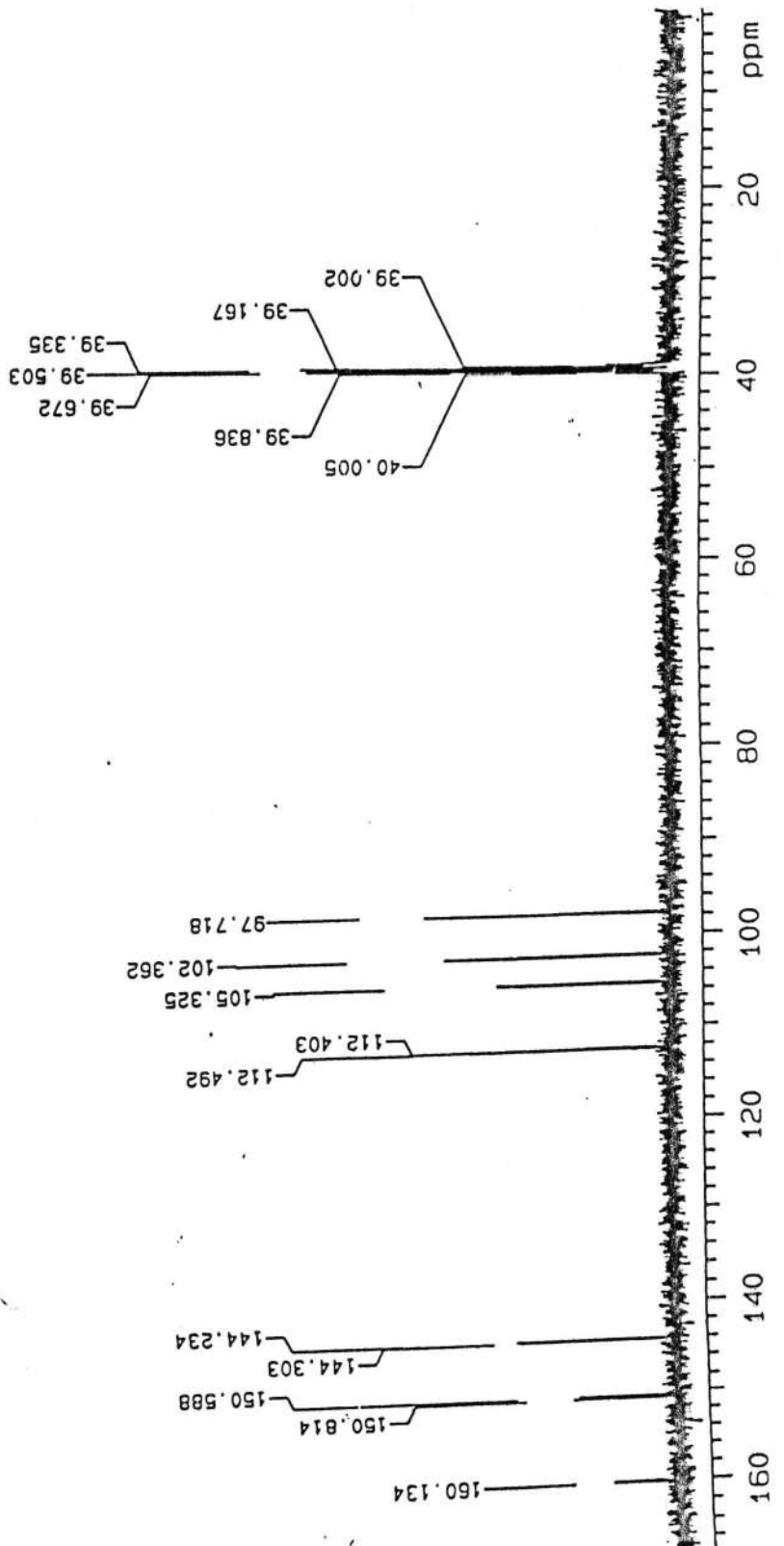
Lampiran : 20 a.

Spektrum ^1H -RMI (500 MHz) dalam DMSO-d_6 pada 40.0 C/313.1 K
dari isolat III



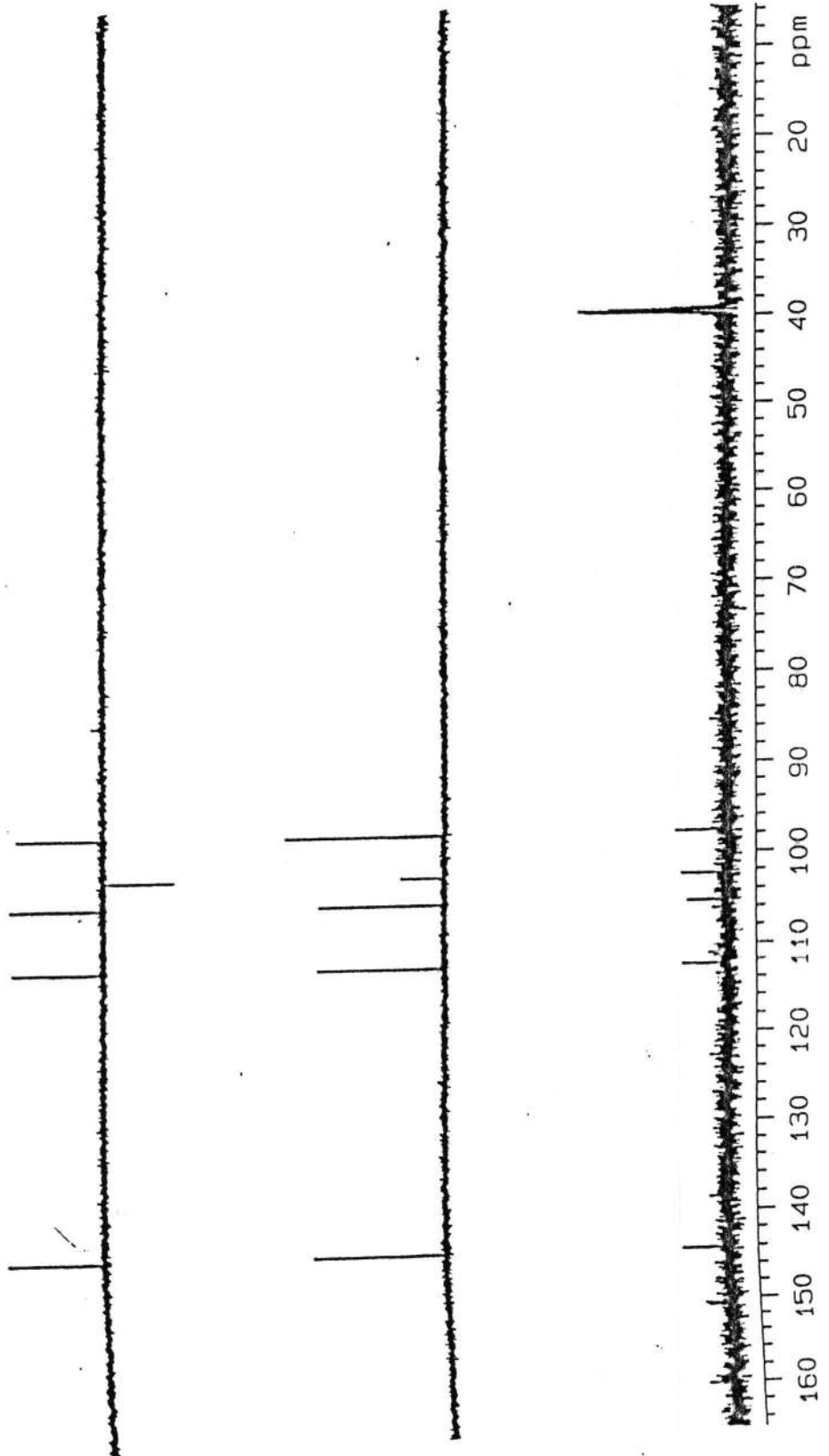
Lampiran : 20 b.

Spektrum ^{13}C -RMI (500 MHz) dalam DMSO-d_6 pada 40.0 C/313.1 K

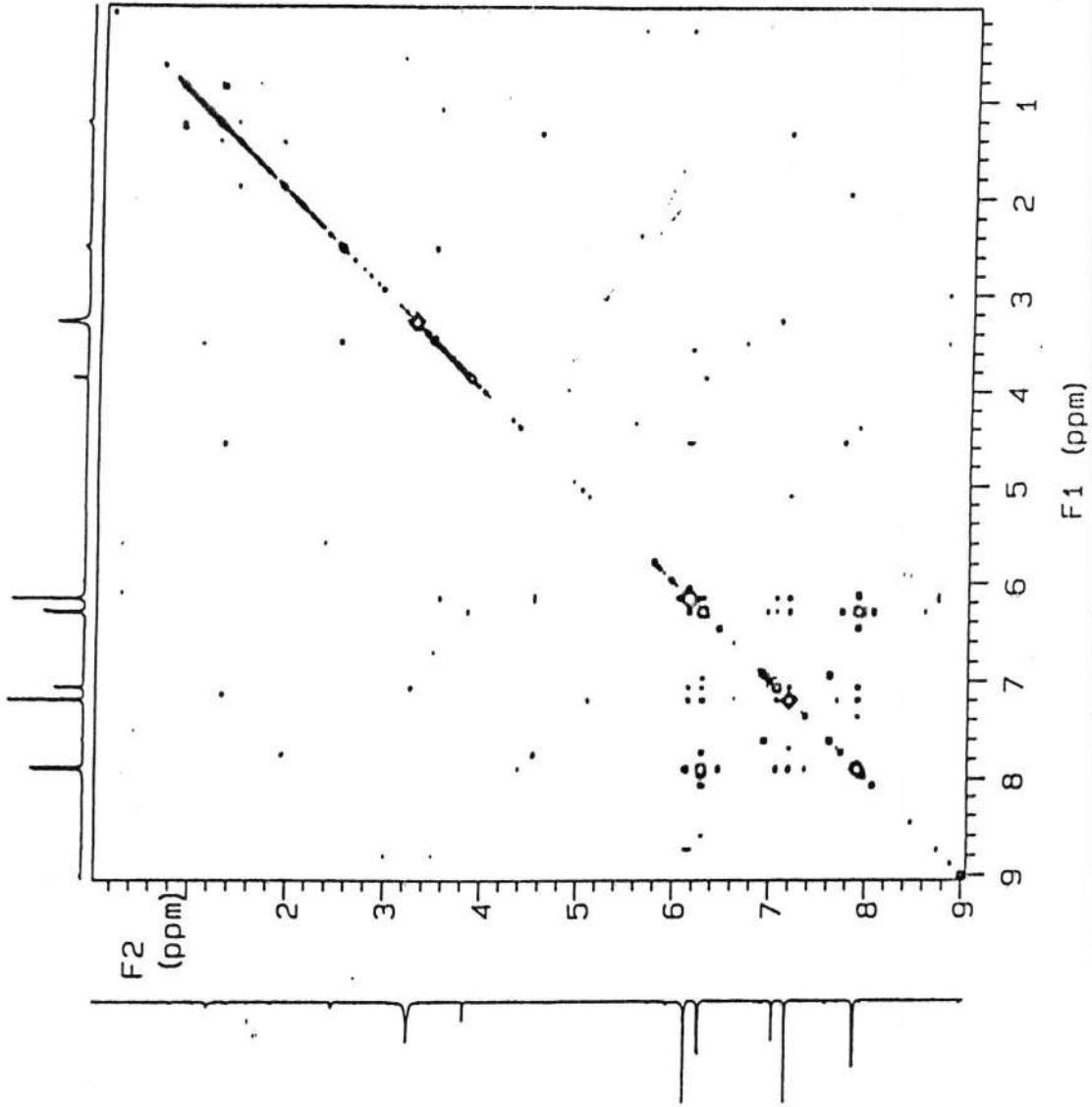


Lampiran : 20 c.

Spektrum DEPT dari isolat III.



Lampiran : 20 d.

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

STANDARD PROTON PARAMETERS

Solvent: DMSO
 Temp. 40.0 C / 313.1 K
 UNITYplus-500 "lppsun2"
 PULSE SEQUENCE: relayh
 Relax. delay 1.000 sec
 COSY 90-90
 Acq. time 0.227 sec
 Width 4503.0 Hz
 2D Width 4503.0 Hz
 4 repetitions
 256 increments
 OBSERVE H1, 499.8668816 MHz
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.114 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.028 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 21 minutes

Lampiran : 20 e.

Spektrum ^{13}C - ^1H cosy dari isolat III.

STANDARD PROTON PARAMETERS

Solvent: DMSO
 Temp. 40.0 C / 313.1 K
 User: 1-14-87
 UNITYplus-500 "ippsun2"

PULSE SEQUENCE: ghsqc_da

Relax. delay 1.162 sec
 Acq. time 0.199 sec
 Width 4503.0 Hz
 2D Width 20060.2 Hz

Single scan

2 x 512 increments

OBSERVE H1, 499.8668816 MHz F2

DECOUPLE C13, 125.7024359 MHz

Power 45 dB

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.199 sec

Shifted by -0.199 sec

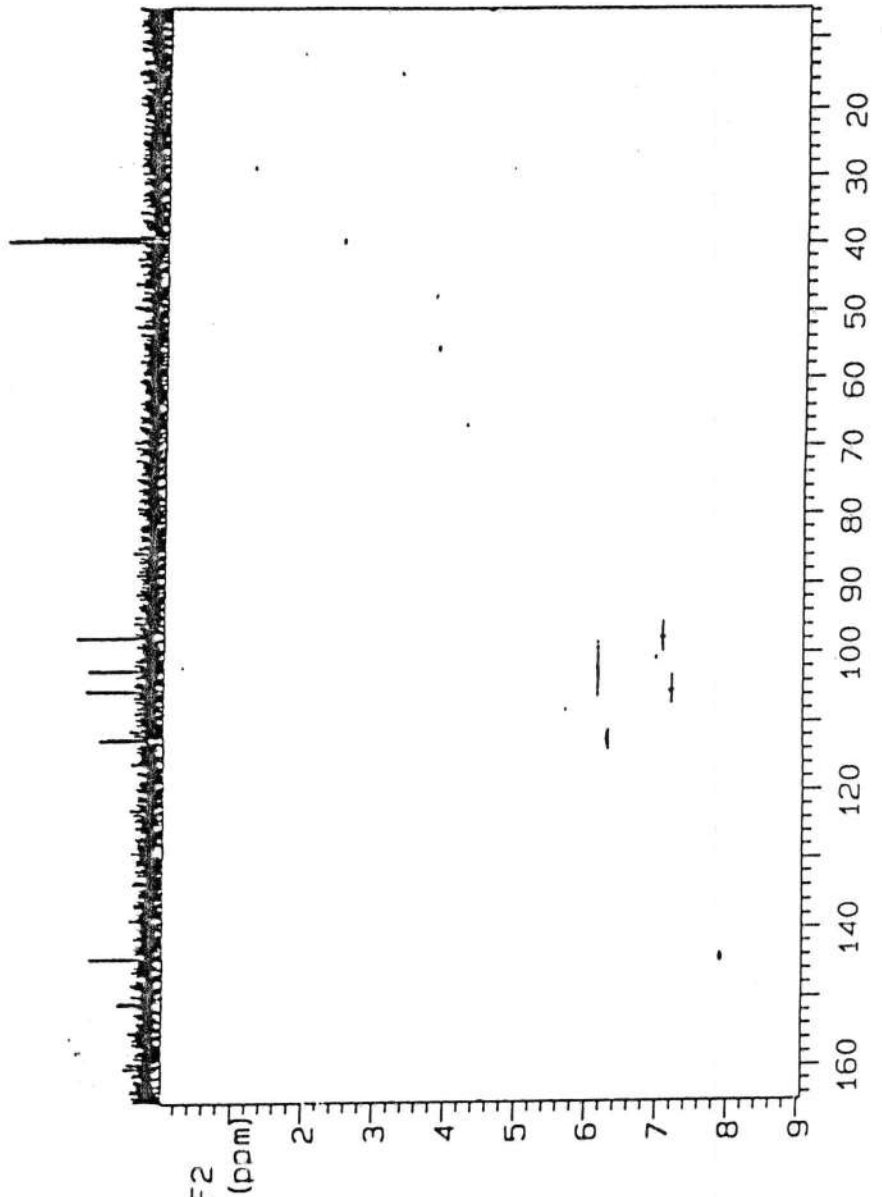
F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.026 sec

Shifted by -0.026 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 24 minutes



Lampiran : 21.

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

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

