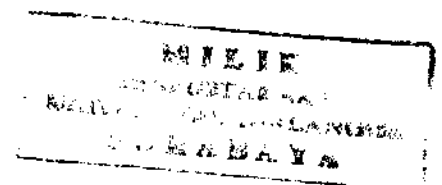


DISERTASI

EFEK ANTIMALARIA SENYAWA FLAVONOID KULIT BATANG CEMPEDAK (*ARTOCARPUS CHAMPEDEN SPRENG*) PADA MORFOLOGI DAN AKTIVITAS BIOKIMIWI PARASIT MALARIA



MARIA NINDATU




PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008

LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 6 MARET 2008**

Oleh

Promotor,



Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP : 130 355 372

Ko Promotor I,



Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc,dr.
NIP : 130 359 278

Ko Promotor II,



dr. Sjafruddin, Ph.D
NIP : 131 569 701

RINGKASAN

**EFEK ANTIMALARIA SENYAWA FLAVONOID KULIT BATANG
CEMPEDAK (*ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG) PADA MORFOLOGI
DAN AKTIVITAS BIOKIMIWI
PARASIT MALARIA**

Malaria merupakan penyakit parasitik dengan prevalensi yang tertinggi di dunia. WHO melaporkan, 300—500 juta kasus klinis dan 1,5 juta kematian setiap tahunnya. Hampir setengah dari penduduk dunia berisiko terkena penyakit malaria, dimana mortalitas risiko tertinggi dialami oleh anak-anak di bawah 5 tahun dan wanita hamil. Penanggulangan terhadap penyakit malaria saat ini menghadapi beberapa kendala, terutama oleh munculnya galur parasit yang resisten terhadap obat antimalaria yang ada dan belum ditemukannya vaksin antimalaria yang ideal. Oleh karena itu upaya untuk menemukan obat antimalaria baru yang memiliki target yang berbeda dengan obat malaria yang telah resisten saat ini merupakan prioritas utama program penanggulangan malaria.

Artocarpus champeden Spreng. [sinonim *A. integer* (Thun) Merr.], termasuk ke dalam suku *Moraceae*, banyak tumbuh baik di daerah tropis maupun subtropis di Asia Tenggara. Di Indonesia, tanaman ini umumnya dikenal dengan nama "Cempedak", buahnya banyak dikonsumsi masyarakat dan kulit batangnya telah digunakan secara tradisional untuk mengobati demam, diare dan malaria. Tanaman ini mengandung senyawa golongan flavonoid yang memiliki khasiat antikanker, antiinflamasi dan imunomodulator.

Penelitian pendahuluan terhadap kulit batang *A. champeden* telah dilakukan, dan ekstrak diklorometana dan metanolnya telah dibuktikan memiliki aktivitas antimalaria yang poten terhadap *Plasmodium falciparum in vitro* dan *P. berghei* ANKA *in vivo*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antimalaria senyawa flavonoid yang diisolasi dari kulit batang *A. champeden*, khususnya pada morfologi dan aktivitas biokimiawi di vakuola makanan parasit malaria.

Pemisahan ekstrak metanol dilakukan dengan kromatografi kolom vakum pada fase diam silika gel menggunakan pelarut kloroform-etil asetat, menghasilkan 5 fraksi utama. Isolasi senyawa hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom, dan Kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif menggunakan fase normal dan fase terbalik (*reverse phase*) menghasilkan 1 senyawa, selanjutnya disebut ME1 dan 1 isolat yang mengandung flavonoid (ME2). Elusidasi struktur dengan analisis spektroskopi menunjukkan bahwa senyawa ME1 tersebut merupakan senyawa yang sudah ditemukan sebelumnya, yaitu morakhaikon A, sedangkan isolat ME2 mengandung senyawa flavonoid dari golongan khalkon.

Uji aktivitas antimalaria terhadap senyawa Morakhalkon A dan ME2 dan 3 senyawa flavonoid lainnya, yang diisolasi dari ekstrak diklorometana Sikloheterofilin, Artoindonesianin A2 dan R, pada biakan *P. falciparum* 3D7 *in vitro* menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut menghambat pertumbuhan parasit secara bermakna, dengan IC_{50} masing-masing 0,28; 0,35; 0,08; 0,49 dan 0,53 $\mu\text{g/ml}$.

Analisis morfologi parasit setelah diinkubasi dengan senyawa-senyawa Morakhalkon A, ME2, dan 3 senyawa dari ekstrak diklorometana *A. champeden* yaitu Sikloheterofilin, Artoindonesianin A-2 dan R menunjukkan adanya perubahan morfologi parasit dalam bentuk trophozoit yang terletak di luar eritrosit, pembengkakan vakuola makanan dan hemozoin yang berwarna hitam. Disamping itu, siklus pertumbuhan parasit ditemukan lebih lambat dibanding kelompok parasit yang tidak diobati. Analisis ultrastruktur parasit menunjukkan tidak ditemukannya hemozoin pada kelompok parasit yang diinkubasi dengan senyawa Morakhalkon A dan ME2. Sedangkan kelompok parasit yang diinkubasi dengan Sikloheterofilin, Artoindonesianin A-2 dan R tidak memiliki perbedaan dengan kelompok kontrol.

Analisis aktivitas biokimiawi parasit di vakuola makanan dengan menggunakan uji hambatan degradasi hemoglobin dan uji hambatan pembentukan β -hematin *in vitro* (β -hematin inhibition assay) menunjukkan bahwa semua senyawa menghambat proses degradasi hemoglobin. Namun, senyawa morakhalkon A dan ME2 juga dapat menghambat pembentukan β -hematin *in vitro*, seperti inhibitor spesifik, klorokuin.

Hasil-hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang diuji memiliki aktivitas antimalaria yang poten, melalui hambatan degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme serta mekanisme lain yang belum diketahui.

Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut sangat potensial untuk dikembangkan sebagai obat antimalaria baru.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Persetujuan	iii
Ucapan Terimakasih	iv
Ringkasan	ix
Summary	x
Abstrak	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxv

BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	10
1.3. Tujuan Penelitian	10
1.3.1. Tujuan umum	10
1.3.2. Tujuan khusus	11
1.4. Manfaat Penelitian	11
1.4.1. Manfaat teoritis	11
1.4.2. Manfaat praktis	12
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	13
2.1 Malaria	13
2.1.1 Malaria secara global	13
2.1.2 Malaria di Indonesia	14
2.2 Parasit Resistensi Obat Malaria	17
2.2.1. Obat antimalaria	17
2.2.2. Tinjauan tentang antimalaria dari bahan alam	18
2.2.3. Kasus resistensi obat antimalaria	20
2.3 Parasit Malaria	23
2.3.1. Siklus hidup parasit malaria	23
2.3.2. Parasit malaria intraeritrosit	25
2.3.3. Degradasi hemoglobin dalam vakuola makanan ...	28
2.3.4. Detoksifikasi heme parasit malaria	31
2.4 Tanaman Cempedak (<i>Artocarpus champeden</i> Spreng) ..	34
2.4.1. Klasifikasi tanaman	34
2.4.2. Deskripsi tanaman	35
2.4.3. Kegunaan tanaman	36
2.4.4. Kandungan senyawa cempedak (<i>A. champeden</i>)..	36
2.5 Senyawa Flavonoid dan aktivitas Antimalaria	40
2.5.1. Senyawa flavonoid	40
2.5.2. Aktivitas antimalaria senyawa flavonoid	42

2.6	Tinjauan Tentang Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam	44
2.6.1.	Kromatografi lapisan tipis	46
2.6.2.	Kromatografi kolom	47
2.7	Tinjauan Spektroskopi	48
2.7.1.	Spektroskopi Infra Merah	48
2.7.2.	Spektroskopi resonansi magnetik inti (RMI)	49
2.8	Tinjauan Densitometri	50
2.9	Studi ultrastruktur parasit malaria dan skrining obat baru..	50
2.10	Sodium dodesil sulfat - poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE)	52
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	54
3.1.	Kerangka konseptual penelitian	54
3.2.	Hipotesis	57
BAB 4	METODE PENELITIAN	58
4.1.	Rancangan Penelitian	58
4.2.	Sampel Penelitian	64
4.3.	Variabel Penelitian	66
4.4.	Definisi Operasional	66
4.5.	Bahan Penelitian	66
4.6.	Instrumen Penelitian	68
4.7.	Lokasi dan waktu	69
4.8.	Prosedur Penelitian	70
4.8.1.	Isolasi, fraksinasi dan permurnian senyawa aktif kulit batang <i>A.champeden</i>	70
4.8.2.	Penentuan struktur dan identifikasi senyawa flavonoid	72
4.8.3.	Uji aktivitas antimalaria <i>in vitro</i>	73
4.8.4.	Prosedur uji efek isolat dan senyawa aktif terhadap kondisi morfologi parasit	78
4.8.5.	Prosedur uji degradasi hemoglobin	81
4.8.6.	Prosedur uji hambatan senyawa aktif terhadap	

<i>detoksifikasi heme sintetis (β- Haematin Inhibitory Activity: BHIA)</i>	83
4.9 Kerangka Operasional Penelitian	84
Bab 5 HASIL PENELITIAN	86
5.1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi	86
5.1.1. Ekstraksi simplista	86
5.1.2. Fraksinasi ekstrak metanol dengan kromatografi kolom vakum (<i>Vacuum Liquid Chromatografi =VLC</i>)	87
5.1.3. Pemisahan fraksi MEII menggunakan kromatografi kolom lambat	89
5.1.4. Pemisahan traksi ME II.3 menggunakan KLT Preparatif	92
5.1.5 Pemisahan Fraksi ME II.4 menggunakan KLT Preparatif	96
5.2. Hasil Identifikasi senyawa ME1	99
5.2.1. Identifikasi dengan penampak noda dan pereaksi warna	99
5.2.2. Identifikasi dengan densitometer	99
5.2.3. Identifikasi profil dengan spektra UV	100
5.2.4. Identifikasi dengan spektrometri infra merah.....	100
5.2.5. Hasil identifikasi dengan metode spektrofotometri RMI	101
5.3. Identifikasi Isolat ME 2	103
5.3.1. Identifikasi dengan penampak noda dan pereaksi warna	103
5.3.2. Identifikasi Isolat ME2 dengan Densitometer	103
5.3.3. Identifikasi Profil Spektra UV	103
5.3.4. Identifikasi dengan FTIR	104
5.4. Uji aktivitas antimalaria Isolat dan senyawa aktif antimalaria <i>A.champeden</i>	105
5.5. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap morfologi parasit	109

5.6. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap biokimiawi parasit malaria	125
5.6.1. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap hambatan degradasi hemoglobin	125
5.6.2. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap hambatan β -hematin (<i>β-Haematin Inhibition Assay (BHIA)</i>)	127
5.6.3. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap hambatan senyawa aktif antimalaria terhadap detoksifikasi heme Plasmodium secara ultrastruktur	131
BAB 6 PEMBAHASAN	134
6.1. Elusidasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Isolasi dari Ekstrak Metanol Kulit Batang <i>Artocarpus champeden</i> Spreng	134
6.1.1. Elusidasi dan identifikasi senyawa ME1	134
6.1.2. Elusidasi dan identifikasi isolat ME2	137
6.2. Efek antimalaria <i>in vitro</i> fraksi ME II ekstrak metanol <i>A. champeden</i>	139
6.3. Efek antimalaria isolat dan senyawa flavonoid <i>A. champeden</i>	140
6.4. Efek Flavonoid Pada Aktivitas Biokimia Vakuola Makanan Parasit Malaria	143
6.4.1. Efek flavonoid pada proses degradasi hemoglobin	143
6.4.2. Efek flavonoid pada proses detoksifikasi heme ..	154
6.5. Prospek senyawa flavonoid aktif antimalaria dari <i>A. champeden</i> terhadap patogenesis penyakit malaria	170
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	178
7.1. KESIMPULAN	178
7.2. SARAN	179
DAFTAR PUSTAKA	180
LAMPIRAN	198

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1.	Berat dari masing-masing ekstrak hasil maserasi serbuk kulit batang <i>A. champeden</i> Spreng	86
Tabel 5.2.	Data geseran kimia Spektra ¹ H dan ¹³ C RMI dari Isolat ME1	102
Tabel 5.3.	Nilai IC ₅₀ dari Senyawa hasil isolasi ekstrak metanol dan diklorometana kulit batang <i>A. champeden</i> pada uji antimalaria <i>in vitro</i>	109
Tabel 5.4.	Persen hambatan pembentukan β-hematin oleh senyawa aktif <i>A. champeden</i> (β-hematin Inhibitor Assay)	129
Tabel 5.5.	Fenomena efek senyawa aktif <i>A. champeden</i> terhadap morfologi dan aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan terhadap parasit malaria	133
Tabel 6.1.	Hubungan struktur senyawa pada hambatan degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme senyawa flavonoid dibandingkan klorokuin dan artemisinin	166
Tabel 6.2.	Target spesifik isolat dan senyawa kulit batang <i>A. champeden</i> pada vakuola makanan parasit malaria	175

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Siklus hidup Plasmodium	24
Gambar 2.2. Bagan tahapan invasi parasit malaria ke dalam eritrosit	26
Gambar 2.3. Aktivitas dalam vakuola makanan parasit malaria	30
Gambar 2.4. Skema pengambilan hemoglobin dan proses detoksifikasi heme pada parasit malaria	34
Gambar 2.5. Gambar tanaman cempedak	36
Gambar 2.6. Jenis-jenis flavonoid dari <i>A. champeden</i> Spreng	39
Gambar 2.7. Struktur dasar Flavonoid. Cincin A dan cincin B dihubungkan dengan 3 atom carbon ("three-carbonbridge")	41
Gambar 3.1. Skema kerangka konseptual	54
Gambar 4.1. Rancangan penelitian uji antimalaria <i>in vitro</i>	60
Gambar 4.2. Rancangan penelitian uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria terhadap pada morfologi parasit malaria menggunakan mikroskop cahaya	61
Gambar 4.3. Rancangan penelitian uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria pada morfologi vakuola makanan parasit menggunakan mikroskop elektron transmisi	62
Gambar 4.4. Rancangan penelitian uji degradasi globin secara <i>in vitro</i>	63
Gambar 4.5. Rancangan penelitian uji hambatan β -hematin Sintetis	64
Gambar 4.6. Skema rancangan penelitian	65

Gambar 4.7. Kerangka operasional penelitian	85
Gambar 5.1. Skema fraksinasi ekstrak metanol kulit batang cempedak (<i>A. champeden</i> Spreng) dengan kromatografi kolom vakum	88
Gambar 5.2. Kromatogram hasil KLT 5 fraksi hasil pemisahan Ekstrak metanol, fase gerak CHCl_3 : MeOH =5% fase diam silika gel GF 254 dan penampak noda cerri-sulfat 1 %	89
Gambar 5.3. Grafik rata-rata laju pertumbuhan parasit pada pemberian Fraksi ME II ekstrak metanol secara <i>In vitro</i>	90
Gambar 5.4. Skema pemisahan fraksi ME II ekstrak metanol dengan menggunakan kromatografi kolom lambat	91
Gambar 5.5. Kromatogram hasil KLT 7 fraksi hasil pemisahan fraksi ME II, fase gerak CHCl_3 : MeOH 10 % fase diam silika gel GF 254 dan penampak noda cerri-sulfat 1 %	92
Gambar 5.6. Profil HPLC ME II 3.1, Sistem : fase gerak ACN: MeOH: H_2O (3: 3 :4), fase diam : kolom RP-18 (ODS)	93
Gambar 5.7. Kromatogram hasil KLT dari 5 Subfraksi utama hasil pemisahan MEII.3.1 dengan fase gerak CHCl_3 : MeOH 10% fase diam silika gel GF 254 dan penampak noda cerri-sulfat 1 %	94
Gambar 5.8. Skema pemisahan sub fraksi ME II.3 ekstrak Metanol kulit batang cempedak (<i>A. champeden</i> Spreng) dengan menggunakan lempeng KLT preparatif	95
Gambar 5.9. Skema fraksinasi fraksi ME II.4. ekstrak metanol kulit batang cempedak (<i>A. champeden</i> Spreng) dengan menggunakan KLT preparatif	96

Gambar 5.10	Kromatogram hasil KLT 3 fraksi hasil pemisahan MEII.4 dan KLT 5 sub fraksi utama pemisahan MEII.4.2 dengan fase gerak CHCl_3 : MeOH =10% fase diam silika gel GF 254 dan penampak noda cerri-sulfat 1 %	97
Gambar 5.11	Skema ekstraksi dan isolasi ekstrak metanol kulit batang <i>A. champeden</i> Spreng	98
Gambar 5.12	Profil densitometer isolat ME1, ekstrak metanol kulit batang cempedak (<i>A. champeden</i>) pada UV. 365 nm	99
Gambar 5.13	Spektra UV dari isolat ME1 pada panjang gelombang 365 nm menggunakan densitometer "Camag" TLC Scanner 3 (Cats version 4.06)	100
Gambar 5.14	Spektra IR dari isolat ME1	101
Gambar 5.15	Profil Densitometer isolat ME 2, pada UV. 365 nm ...	103
Gambar 5.16	Spektra UV dari isolat ME2 pada panjang gelombang 365 nm menggunakan densitometer "Camag" TLC Scanner 3 (Cats version 4.06)	104
Gambar 5.17	Spektra IR dari isolat ME2	105
Gambar 5.18	Grafik Laju pertumbuhan <i>P.falciparum</i> pada pemberian Isolat dan senyawa dari kulit batang <i>A.champeden</i>	106
Gambar 5.19	Morfologi <i>P.falciparum</i> 3D7 pada kultur parasit yang diinkubasi dengan isolat dan senyawa <i>A.champeden</i> selama 0-48 jam	112
Gambar 5.20	Morfologi <i>P.falciparum</i> 3D7 pada kultur parasit yang diinkubasi dengan isolat dan senyawa <i>A. champeden</i> selama 0-48 jam.....	114
Gambar 5.21	Perubahan morfologi stadium trophozoit <i>P. falciparum</i> (strain 3D7) yang diinkubasi dengan isolat dan senyawa aktif antimalaria <i>A.champeden</i> pada jam 36-48 jam	116

Gambar 5.22	Gambaran ultrastruktur stadium trofozoit <i>P.falciparum</i> yang berada di dalam sel eritrosit	120
Gambar 5.23	Grafik tingkat parasitemia <i>P.falciparum</i> 3D7 yang diinkubasi senyawa <i>A.champeden</i> pada waktu pengamatan 0, 6, 12, 24, 36 dan 48 jam secara <i>in vitro</i>	123
Gambar 5.24	Grafik persen parasitemia berdasarkan stadium pertumbuhan <i>P.falciparum</i> 3D7 yang diinkubasi senyawa <i>A.champeden</i> pada waktu pengamatan 0, 6, 12, 24, 36 dan 48 jam secara <i>in vitro</i>	124
Gambar 5.25	Hasil Elektroforesis <i>P.falciparum</i> pada pemberian isolat dan senyawa <i>A.champeden</i>	126
Gambar 5.26	Grafik hambatan pembentukan β -hematin oleh isolat senyawa aktif <i>A.champeden</i> (β -hematin Inhibitor Assay)	129
Gambar 6.1.	Struktur kimia senyawa Morakhalkon A.....	137
Gambar 6.2.	Hubungan struktur dan aktivitas senyawa <i>A. champeden</i> pada proses biokimiawi di vakuola makanan parasit malaria	168
Gambar 6.3.	Target spesifik isolat dan senyawa kulit batang <i>A.champeden</i> pada parasit malaria	176

DAFTAR LAMPIRAN

<p>LAMPIRAN 1 IDENTIFIKASI DAN SPEKTRA RMI SENYAWA ME 1 EKSTRAK METANOL <i>ARTOCARPUS CHAMPEDEN</i> SPRENG</p>	198
<p>LAMPIRAN 2 PERSEN PERTUMBUHAN DAN HAMBATAN <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> (STRAIN 3D7) OLEH ISOLAT DAN SENYAWA DARI <i>ARTOCARPUS CHAMPEDEN</i> SPRENG <i>IN VITRO</i></p>	203
<p>LAMPIRAN 3 RINGKASAN HASIL ANALISIS PROBIT FRAKSI FMEII, ISOLAT DAN SENYAWA DARI <i>ARTOCARPUS</i> <i>CHAMPEDEN</i> SPRENG</p>	204
<p>LAMPIRAN 4 PENGUKURAN KADAR PROTEIN PARASIT MALARIA YANG DIBERIKAN SENYAWA AKTIF <i>ARTOCARPUS</i> <i>CHAMPEDEN</i> DENGAN METODE BRADFORD</p>	213
<p>LAMPIRAN 5 PERSEN HAMBATAN PEMBENTUKAN β-HEMATIN OLEH SENYAWA AKTIF ANTIMALARIA <i>ARTOCARPUS</i> <i>CHAMPEDEN</i> SPRENG</p>	215

DAFTAR SINGKATAN

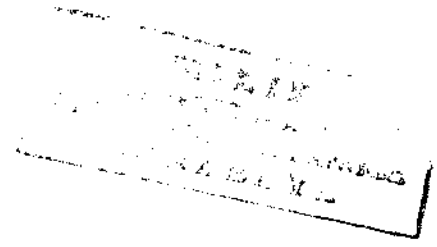


AMI	: <i>Annual Malaria Incidence</i>
APS	: <i>Ammonium persulfat</i>
API	: <i>Annual parasite incidence</i>
CPD	: <i>Citrate Phosphate Dextrose</i>
CRT	: <i>Chloroquin resistance transporter,</i>
DMAE	: <i>Dimethylaminoethanol</i>
DMSO	: <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DFM	: <i>Dimetilformamida</i>
DE	: Ekstrak diklorometana
FBS	: <i>Foetal Bovine Serum</i>
HE	: Ekstrak heksana
IRBC	: <i>Infected Red Blood Cell</i>
KCKT	: Kromatografi Cair Kecepatan Tinggi
KLB	: Kejadian Luar Biasa
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
KAHRP	: <i>Knob-associated histidine-rich protein</i>
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
MDR	: <i>Multi-drug resistance gene 1</i>
ME	: Ekstrak metanol
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PVM	: <i>Parasitophorous vacuolar membrane</i>
PTLC	: <i>Preparative Thin Layer Chromatography</i>
<i>PfEMP1</i>	: <i>P. falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
<i>Pfmdr1</i>	: <i>Plasmodium falciparum multi drug resistant 1</i>
PBS	: <i>Phosphat-buffered saline</i>

- Rf** : *Retardation factor*
RMI : Resonansi Magnetik Inti
SDS-PAGE : *Sodium dodesil sulfat - poliakrilamid gel elektroforesis*
SKRT : Survei Kesehatan Rumah Tangga
TMS : *Tetrametilsilan*
TEMED : *Tetrametiletildiamina*
UV/VIS : *Ultraviolet/Visible*
VCD : *Vynilcyclophene dioxide resin*
Fe(III)PPIX : Besi (III) protophorphyrin IX



BAB 1
PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang tersebar di seluruh dunia mulai dari daerah tropik, sub tropik sampai ke daerah beriklim dingin. Penyakit malaria pada saat ini menjadi masalah kesehatan masyarakat (*public health problem*) di lebih dari 90 negara, yang dihuni oleh 2,4 milyar penduduk atau 40% populasi penduduk dunia. WHO memperkirakan sekitar 300-500 juta orang terinfeksi setiap tahun dan 1,5 -2,7 juta orang meninggal karena malaria (Burke *et al*, 2003; Saxena *et al*, 2003). Di Indonesia, menurut hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001, terdapat 70 juta penduduk tinggal di daerah endemik malaria dan 56,3 juta penduduk diantaranya tinggal di daerah endemik malaria sedang sampai tinggi. Meskipun insiden malaria sejak tahun 2000 cenderung menurun, tetapi masih terjadi kejadian luar biasa (KLB) malaria pada 7 Propinsi yang menyerang 35 desa dan menyebabkan kematian sebesar 211 orang penduduk (DepKes, 2004).

Upaya penanggulangan terhadap penyakit ini telah banyak dilakukan, namun angka kesakitan dan kematian malaria di beberapa negara masih tetap tinggi. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, misalnya migrasi manusia secara besar-besaran, perubahan iklim dan lingkungan, sistem

pelayanan kesehatan yang kurang baik, serta timbulnya galur parasit malaria yang resisten terhadap obat antimalaria dan galur nyamuk *Anopheles* yang

- resisten terhadap insektisida.

Tumbuh dan menyebarnya resistensi terhadap obat antimalaria lapis pertama (*first-line antimalarial drugs*) yaitu klorokuin dan pirimetamin-sulfadoksin yang dipakai pada pengobatan dan pencegahan malaria telah menimbulkan banyak masalah pada program penanggulangan malaria. Kendala lainnya yaitu belum berhasilnya upaya untuk menemukan vaksin malaria yang ideal. Oleh karena itu aktivitas riset yang bertujuan untuk mengidentifikasi target intervensi kemoterapi dan penemuan obat antimalaria baru menjadi sarana utama dalam upaya penanggulangan malaria.

Obat antimalaria baru dengan target yang efektif (*rapid efficacy*), toksisitas rendah (*minimal toxicity*) dan terjangkau bagi masyarakat (*Low cost*) sangat mutlak diperlukan bila dampak malaria ingin dikurangi atau bahkan diatasi. Oleh karena itu pengembangan obat antimalaria baru dengan target obat yang potensial sangat dibutuhkan dalam mengatasi penyakit ini (Shenai *et al*, 2000; Singh *et al*, 2001; Burke *et al*, 2003; Syafruddin *et al*, 2004).

Penggunaan tumbuhan atau bagian tumbuhan untuk obat malaria sudah dikenal sejak ribuan tahun yang lalu. Obat malaria yang tertua adalah kinina (alkaloid yang ditemukan pada tahun 1632), diambil dari kulit batang kina (*Cinchona, sp*) dan karena efek samping yang besar (tinnitus, vertigo, gangguan fungsi mata) dan kemajuan di bidang kimia, kina diganti dengan

obat malaria sintetik seperti amodiakuin, klorokuin dan sebagainya (Phillipson and Wright, 1991). Obat malaria yang saat ini telah dikembangkan dan menjadi obat pilihan adalah artemisinin (suatu senyawa seskuiterpen lakton) beserta turunannya juga berasal dari tumbuhan.

Artocarpus champeden Spreng (famili Moraceae) atau dikenal dengan nama daerah cempedak, banyak ditemukan di Indonesia dan digunakan antara lain sebagai bahan pangan, bahan bangunan dan bahan ramuan obat tradisional, antara lain sebagai obat malaria, disentri dan penyakit kulit (Heyne,1987; Hakim,2006). Di Papua, secara empiris, kulit batang tumbuhan ini digunakan untuk mengobati penyakit malaria (Utomo, 2003).

Penelitian untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari kulit batang *Artocarpus champeden* telah dilakukan. Ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* pada kultur *in vitro* ($IC_{50} = 0,9953 \mu\text{g/ml}$) dan secara *in vivo* ($ED_{50}=0,0078 \text{ mg/kg BB}$) pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* (Zaini dkk, 2005). Selanjutnya isolasi terhadap ekstrak diklorometana untuk mendapatkan senyawa aktif yang berpengaruh pada aktivitas antimalaria juga telah dilakukan. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa senyawa flavonoid yang diisolasi dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* yaitu heteroflavanon C, sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R, heterofilin, artonin A dan senyawa baru artocarpon A dan B memiliki aktivitas antimalaria yang poten (Zaini dkk, 2005; Widyawaruyanti *et al*, 2007).

Beberapa laporan penelitian sebelumnya juga menjelaskan bahwa senyawa flavonoid mempunyai aktivitas farmakologik antara lain sebagai antimalaria. Senyawa stilbene terprenilasi dari *A. integer* dilaporkan mempunyai aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P.falciparum* (Boonlaksiri *et al*, 2000). Senyawa metiltetrahydroamentoflavon yaitu golongan flavonoid dari famili Moraceae dan beberapa flavonoid yang diisolasi dari tanaman *Rhus retinorrhoe* juga memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* (Ahmed *et al*, 2001). Selanjutnya penelitian Oliveira *et al* (2004), menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dari ekstrak etanol tanaman *Biden pilosa* memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap *P. falciparum*.

Di lain sisi ekstrak metanol dari kulit batang *A.champeden* telah dilaporkan juga memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* dengan $IC_{50}=4,5717 \mu\text{g/ml}$ dan *in vivo* dengan $ED_{50}=0,0376 \text{ mg/kg BB}$ (Dhani dkk, 2003; Agriana dkk, 2003; Zaini dkk, 2005; Maximus,2006) dan aktivitas tersebut diduga karena senyawa flavonoid (Maximus,2006).

Menurut Kohler *et al* (2002), suatu ekstrak yang memiliki nilai IC_{50} kurang dari $50 \mu\text{g/ml}$ dan fraksi yang memiliki nilai IC_{50} kurang dari $25 \mu\text{g/ml}$ pada uji *in vitro* dapat dikatakan prospektif untuk dikembangkan sebagai obat antimalaria. Dari hasil-hasil penelitian tersebut, terlihat bahwa nilai IC_{50} ekstrak metanol jauh di bawah $50 \mu\text{g/ml}$ sehingga potensial untuk diisolasi kandungan senyawa aktifnya serta dikembangkan sebagai obat antimalaria. Oleh karena itu, isolasi lebih lanjut untuk mengetahui jenis senyawa flavonoid

aktif antimalaria yang terkandung dalam ekstrak metanol tanaman ini prospektif untuk dilakukan.

Proses isolasi yang dituntun aktivitas (*bioactivity guided isolation*) untuk menapis bahan alam sebagai obat antimalaria diharapkan dapat menyediakan obat baru dengan mekanisme dan target obat yang potensial (Rosenthal, 1997; Biagini *et al*, 2003; Fidock *et al*, 2004).

Beberapa mekanisme dan target obat antimalaria potensial yang dikembangkan berhubungan dengan hambatan pada struktur organel parasit antara lain : pemecahan sel protein host (*targeting the cleavage of host cell protein*), transporter parasit (*targeting parasite transporters*), organel plastida (*targeting plastida organelle*), biosintesis isoprenoid (*targeting isoprenoid biosynthesis*), kontrol siklus sel (*targeting cell cycle control*), fungsi mitokondria (*targeting mitochondrial function*) dan biosintesis membran (*targeting membrane biosynthesis*) (Ridley, 2002; Biagini *et al*, 2003; Fidock *et al*, 2004).

Berdasarkan target obat antimalaria potensial yang dikembangkan sampai saat ini, mekanisme aksi senyawa flavonoid telah dilaporkan memiliki dua target utama yaitu : 1). membran yang dibentuk parasit malaria intraeritrositik yaitu jalur permeasi baru (*New Permeation Pathway=NPP*) (Sherman, 1998; Kirck, 2001) dan 2). vakuola makanan parasit malaria yaitu hambatan pada proses degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme (Biagini *et al*, 2003; Frolich *et al*, 2005; Bilia *et al*, 2006). Perbedaan target potensial

senyawa flavonoid yang berbeda ini diduga berhubungan dengan gugus aktif senyawa flavonoid yang berbeda.

Berkaitan dengan target senyawa flavonoid pada jalur permeasi baru (NPP), Kutner *et al* (1987) melaporkan bahwa senyawa phlorizin, suatu glikosida bioflavonoid diketahui memiliki aktivitas antiplasmodial dengan mekanisme hambatan pada NPP. Go *et al* (2004) juga melaporkan adanya mekanisme hambatan NPP oleh senyawa khalkon suatu flavonoid minor pada tanaman. Selanjutnya penelitian Widyawaruyanti *et al* (2007) diketahui bahwa 2 (dua) senyawa flavonoid terpenilasi antimalaria yang diisolasi dari ekstrak diklorometana kulit batang cempedak (*A.champeden*), yaitu artoindonesianin A-2 dan artoindonesianin R memiliki potensi sebagai inhibitor jalur permeasi baru pada eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum*. Namun senyawa flavonoid terpenilasi lain yang diujikan yaitu senyawa sikloheterofilin, sebagai salah satu senyawa antimalaria potensial dilaporkan tidak memiliki mekanisme pada NPP tersebut dan diduga memiliki mekanisme lain yang belum diketahui. Berdasarkan hasil penelitian awal, diduga bahwa senyawa sikloheterofilin tersebut berpotensi menghambat proses degradasi hemoglobin parasit malaria. Oleh karena itu ketiga senyawa flavonoid dari ekstrak diklorometana ini, menarik untuk diteliti lebih lanjut mengenai efek dan mekanisme aksi lainnya sebagai obat antimalaria.

Selanjutnya terkait dengan target flavonoid pada vakuola makanan parasit malaria, beberapa pustaka telah melaporkan mekanisme aksi senyawa flavonoid pada proses degradasi hemoglobin dan hambatan

detoksifikasi heme parasit malaria. Biagini *et al* (2003), melaporkan bahwa khalkon, suatu senyawa flavonoid minor yang terdapat dalam jumlah terbatas pada tumbuhan mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan parasit melalui mekanisme penghambatan enzim sistein protease. Hambatan terhadap enzim ini dapat menyebabkan terhambatnya proses hidrolisis hemoglobin menjadi globin dan selanjutnya menghambat pembentukan oligopeptida dan asam amino sebagai nutrient esensial pembentukan protein bagi pertumbuhan parasit malaria. Go *et al* (2004), juga melaporkan bahwa khalkon dapat menghambat proses degradasi hemoglobin secara *in vitro*, tetapi tidak menghambat enzim sistein protease.

Penelitian lain terhadap aktivitas senyawa xanthohumol dan 7 derivat khalkon terprenilasi dari *Humulus lupulus* telah dilaporkan memiliki aktivitas antiplasmodial dan menghambat proses degradasi hemin (Frolich *et al*, 2005). Selanjutnya Bilia *et al* (2006), melaporkan tentang mekanisme beberapa senyawa flavonoid dari *Artemisia annua* L. sebagai antimalaria yang simultan dalam meningkatkan reaksi artemisinin dengan hemin. Namun sampai saat ini penelitian tentang mekanisme aksi dan target spesifik senyawa flavonoid yang diisolasi dari kulit batang *A.champeden* pada vakuola makanan parasit malaria belum pernah dilakukan.

Oleh karena itu, berhubungan dengan target obat antimalaria yang dikembangkan dewasa ini, maka kajian tentang efek senyawa flavonoid dari *A.champeden* pada vakuola makanan parasit malaria sangat menarik untuk diteliti. Hal ini terkait dengan peran vakuola makanan sebagai tempat

hemoglobin, maka inhibitor akan menghambat proses yang terkait dengan pembentukan asam amino sebagai kebutuhan esensial bagi pertumbuhan parasit malaria. Begitu juga hambatan proses detoksifikasi heme, menyebabkan terjadinya penumpukan heme bebas pada vakuola makanan dan akan bersifat toksik sehingga melisis membran, mengakibatkan hemolisis dan menghambat aktivitas beberapa enzim. Hal ini berpengaruh pada metabolisme parasit dan menyebabkan kematian parasit (Sherman, 1998; Pandey *et al*, 1999; Wiser, 2004).

Gilles (1993) mengemukakan bahwa penelitian yang berhubungan dengan proses biokimiawi parasit malaria berperan penting untuk pengembangan obat antimalaria baru. Oleh karena itu, kajian morfologi dan aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan parasit malaria sangat prospektif untuk diteliti terkait dengan penentuan mekanisme dan target potensial dari senyawa flavonoid pada vakuola makanan parasit malaria.

Penelitian ini telah dilakukan dalam beberapa tahap : 1). Ekstraksi, fraksinasi dan isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak metanol kulit batang *A. champeden*, uji aktivitas antimalaria fraksi dan isolat, penentuan struktur senyawa aktif antimalaria dari ekstrak metanol 2). Pengujian efek pemberian senyawa flavonoid dari ekstrak metanol serta senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, dan R aktif antimalaria dari ekstrak diklorometana pada morfologi parasit malaria 3). Pengujian efek senyawa aktif antimalaria pada aktivitas biokimiawi di dalam vakuola makanan parasit malaria, meliputi

penentuan potensi senyawa pada hambatan degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme parasit malaria.

1.2. Rumusan masalah

1. Jenis senyawa flavonoid apa saja yang dapat diisolasi dari kulit batang *A. champeden*?
2. Apakah isolat dan senyawa flavonoid tersebut mempunyai aktivitas sebagai antimalaria dengan menghambat pertumbuhan parasit ?
3. Bagaimana efek isolat dan senyawa flavonoid kulit batang *A. champeden* pada morfologi parasit malaria ?
4. Bagaimana efek isolat dan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari *A. champeden* pada aktivitas biokimiawi vakuola makanan parasit malaria?
 - a. Bagaimana efek isolat dan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari *A. champeden* pada proses degradasi hemoglobin parasit malaria?
 - b. Bagaimana efek isolat dan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari *A. champeden* pada proses detoksifikasi heme parasit malaria?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui efek antimalaria isolat dan senyawa flavonoid yang diisolasi dari kulit batang *A. champeden* pada morfologi dan aktivitas biokimiawi parasit malaria terkait dengan penentuan target senyawa yang potensial.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengisolasi dan menentukan struktur senyawa flavonoid kulit batang *A. champeden* yang aktif sebagai antimalaria.
2. Menguji aktivitas antimalaria isolat dan senyawa flavonoid dari kulit batang *A. champeden*.
3. Menguji efek isolat dan senyawa flavonoid kulit batang *A. champeden* pada morfologi parasit malaria.
4. Menguji efek isolat dan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari kulit batang *A. champeden* pada aktivitas biokimiawi parasit malaria.
 - a. Menguji efek isolat dan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari kulit batang *A. champeden* pada degradasi hemoglobin parasit malaria.
 - b. Menguji efek isolat dan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari kulit batang *A. champeden* pada proses detoksifikasi heme parasit malaria.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

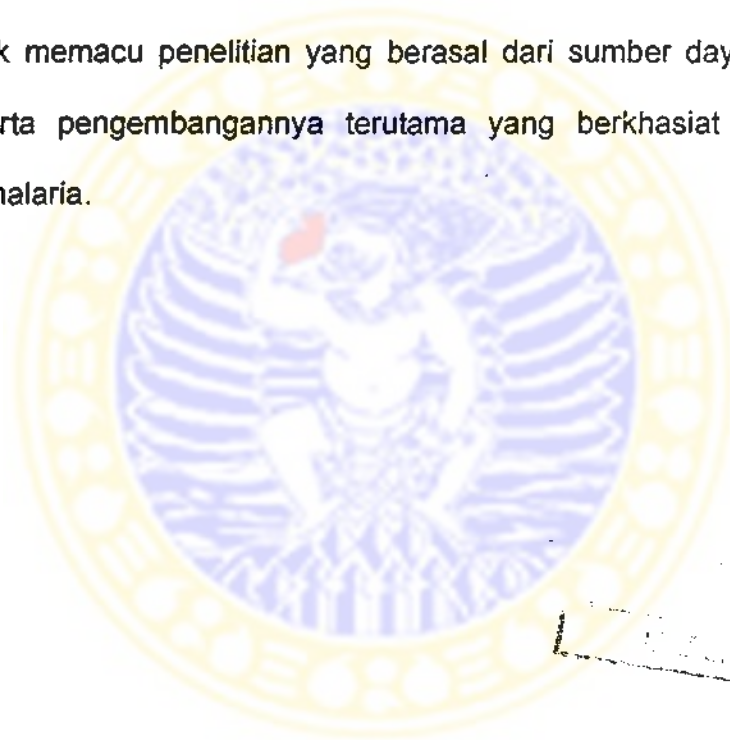
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang :

1. Struktur senyawa aktif antimalaria dari ekstrak metanol kulit batang *A. champeden*.
2. Efek senyawa aktif antimalaria kulit batang *A. champeden* pada morfologi parasit malaria.

3. Target senyawa dan aktivitas biokimiawi senyawa aktif kulit batang *A. champeden* pada vakuola makanan parasit malaria.

1.4.2. Manfaat praktis

1. Mendapatkan bahan dasar obat antimalaria dengan target obat baru dan mekanisme aksi yang potensial.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang obat antimalaria yang berasal dari tanaman sehingga memperkaya wacana tentang obat tradisional.
3. Untuk memacu penelitian yang berasal dari sumber daya alam nabati beserta pengembangannya terutama yang berkhasiat sebagai obat antimalaria.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Malaria secara global

Malaria termasuk penyakit yang ditularkan melalui insekta (*insect born diseases*). Penyakit ini berada pada prevalensi tinggi tiap tahun yang dapat menyebabkan kematian penduduk sekitar 1-2 juta orang dengan 300- 500 juta orang yang terinfeksi. Penyakit ini lebih banyak terjadi pada negara miskin dan negara berkembang. Di Afrika prevalensi penyakit lebih tinggi di bandingkan di negara lain. Kasus-kasus yang tinggi juga terjadi di Asia Timur, China dan India. Di India diperkirakan 40% kasus malaria disebabkan karena *P. falciparum* (Ziegler, 2002; Saxena, 2003).

Malaria hampir ditemukan di semua negara tropis. Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa yang diperkirakan sekitar 150 spesies *Plasmodium* yang dapat ditransmisi melalui nyamuk sebagai vektor pada manusia, rodent, burung dan reptil. Lebih dari 90% kasus-kasus malaria ditemukan di sub Saharan Afrika yang menyebabkan lebih dari 2 juta orang meninggal tiap tahun dengan tingkat mortalitas yang tinggi pada anak-anak dan merupakan penyakit yang hiperendemik. Selain itu India dan Brasil juga merupakan daerah endemik malaria yang tinggi. Malaria juga endemik di Asia Tengah, Amerika Tengah dan Selatan (Krettli *et al*, 2001; Banerjee *et al*, 2002; Burke *et al*, 2003).

Situasi malaria di Asia Tenggara (*South East Asia Region*) dilaporkan bahwa sejak tahun 2000, jumlah kasus bervariasi dan diperkirakan antara 2- 3

juta kasus setiap tahun. Kasus-kasus kematian karena malaria tiap tahun diketahui bahwa sekitar 70 % kasus dilaporkan dari India dan lebih dari 50 % pada kasus malaria di Myanmar (Bjorge, 2004).

2.1.2 Malaria di Indonesia

Malaria masih merupakan penyakit masyarakat di Indonesia terutama di daerah yang masih belum berkembang. Diperkirakan 60 % penduduk Indonesia tinggal di daerah endemis malaria yang tingkat edemisitasnya beragam. Di Jawa-Bali, insiden malaria (*annual parasite incidence/API*) pada tahun 1997 adalah 12 per 100.000 penduduk dan kemudian meningkat tajam (tujuh kali) pada masa krisis ekonomi yaitu menjadi 81 per 100.000 penduduk pada tahun 2000. Peningkatan ini terutama karena terjadinya epidemi atau "kejadian luar biasa" (KLB) di daerah Bukit Menoreh yang meliputi daerah wilayah kerja dari dua kabupaten di provinsi Jawa Tengah yaitu kabupaten Purworejo dan Magelang dan satu kabupaten di provinsi Yogyakarta yaitu kabupaten Kulonprogo. Setelah dilakukan multi-intervensi diantaranya menggunakan obat kombinasi artemisinin (Coartem®) untuk pengobatan malaria, API tersebut menurun menjadi 22 per 100.000 penduduk pada akhir tahun 2003. Di luar Jawa - Bali, insiden malaria klinis (*Annual Malaria Incidence/AMI*) jauh lebih tinggi dilaporkan dibandingkan Jawa-Bali yaitu 16 per 1000 penduduk pada tahun 1997 dan cenderung terus meningkat. Pada masa krisis ekonomi AMI meningkat hampir dua kali lipat yaitu menjadi 31 per 1000 penduduk dan meningkat lagi menjadi 46,5 per 1000 penduduk pada tahun 2003 (DepKes, 2004).

Hal ini karena, selain di luar Jawa-Bali merupakan daerah yang relatif belum berkembang, penggunaan obat yang tidak tepat karena keterbatasan kemampuan pemeriksaan hapusan darah malaria mengakibatkan berkembangnya parasit resisten terhadap obat standar yang dipakai dan kemungkinan terjadinya KLB. Selama tahun 2003, telah terjadi KLB di beberapa daerah dan dilaporkan 205 dari 3.069 penderita malaria meninggal dengan angka kematian 6,7 % (Sub Direktorat Malaria, 2004).

Di Indonesia, menurut hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001, terdapat 70 juta penduduk tinggal di daerah endemik malaria dan 56,3 juta penduduk diantaranya tinggal di daerah endemik malaria sedang sampai tinggi dengan 15 juta kasus malaria klinis (DepKes, 2004).

Penyakit ini lebih banyak terjadi pada negara miskin dan negara berkembang. Di Afrika prevalensi penyakit lebih tinggi di bandingkan di negara lain. Di India diperkirakan 40% kasus malaria disebabkan karena *P. falciparum* (Ziegler, 2002; Saxena *et al*, 2003).

Malaria hampir ditemukan di semua negara tropis. Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa yang diperkirakan sekitar 150 spesies *Plasmodium* yang dapat ditransmisi melalui nyamuk sebagai vektor pada manusia, rodent, burung dan reptil. Lebih dari 90% kasus-kasus malaria ditemukan di sub Sahara Afrika yang menyebabkan lebih dari 2 juta orang meninggal tiap tahun dengan tingkat mortalitas yang tinggi pada anak-anak dan merupakan penyakit yang hiperendemik. Selain itu India dan Brasil juga merupakan daerah endemik

malaria yang tinggi. Malaria juga endemik di Asia Tengah, Amerika Tengah dan Selatan (Krettli *et al* , 2001; Banerjee *et al* , 2002; Burke *et al* , 2003).

Situasi malaria di Asia Tenggara (*South East Asia Region*) dilaporkan bahwa sejak tahun 2000, jumlah kasus bervariasi dan diperkirakan antara 2- 3 juta kasus setiap tahun. Kasus-kasus kematian karena malaria tiap tahun diketahui bahwa sekitar 70 % kasus dilaporkan dari India dan lebih dari 50 % pada kasus-kasus malaria di Myanmar (Bjorge, 2004).

Kasus-kasus malaria menyebabkan beban penyakit juga sangat tinggi. Malaria dapat mengakibatkan anemia, aborsi, kematian janin, prematuritas, berat badan lahir rendah dan kerugian ekonomi (*economic loss*) yang cukup tinggi di daerah endemis. Oleh sebab itu kasus-kasus malaria harus segera ditangani dengan cepat dan diberi pengobatan yang tepat untuk menurunkan angka kesakitan, mencegah terjadinya malaria berat dan komplikasi, mencegah penularan serta meminimalkan dampak terhadap penyakit bagi kesehatan masyarakat (Tjitra, 2004).

P.falciparum merupakan parasit malaria yang menyebabkan sebagian besar malaria berat. Beberapa menit setelah parasit malaria menginfeksi host karena gigitan nyamuk Anopheles, parasit masuk ke hati dan mulai menyerang hepatosit dan selanjutnya mengalami multiplikasi dengan cepat. Ribuan merozoit yang keluar dari hati menyerang sel-sel darah merah. Malaria berat terjadi sesudah proliferasi parasit di dalam eritrosit. Parasit yang menginfeksi host dalam tingkat parasitemia yang tinggi dapat menyebabkan akumulasi sel-sel parasit pada ujung kapiler mikrovaskular sehingga memblok aliran darah dan

mengurangi suplai oksigen lokal dalam tubuh dan menimbulkan berbagai kasus berat pada manusia (Oijun, 2000).

2.2 Parasit Resistensi Obat Malaria

2.2.1 Obat antimalaria

Obat antimalaria yang tersedia di dunia umumnya dapat dikelompokkan sebagai berikut : (1) obat malaria kelompok kuinolin yaitu : klorokuin, kina, primakuin, amodiakuin, meflokuin dan halofantrin. (2) Obat malaria kelompok antifolat yaitu : sulfadoksin, pirimetamin, proguanil, kloroproguanil dan dapson. (3) Kelompok obat antimalaria baru yaitu : artemisinin, lumefrantrin, atovakuon, tafenukuin, pironaridin, piperakuin, artemison, WR 99210 dan antibiotik (WHO, 2000 dalam Tjitra, 2001).

Mekanisme kerja klorokuin umumnya menaikkan pH vakuola makanan parasit sehingga pH vakuola makanan menjadi basa. Dalam pH tersebut klorokuin menghambat pembentukan hemozoin dari heme bebas yang diproduksi parasit dengan mencerna hemoglobin host. Heme bebas yang terakumulasi di dalam vakuola makanan menyebabkan lisis membran dan menghambat berbagai proses metabolisme sehingga menyebabkan kematian parasit malaria (Wiser, 2001; Wiser, 2003).

Klorokuin dan obat antimalaria kelompok kuinolin lainnya telah digunakan untuk kemoterapi lebih dari 40 tahun yang lalu. Keberhasilannya didasarkan pada toksisitasnya yang terbatas, kemudahan penggunaan dan keefektifan biaya. Namun kasus-kasus resistensi parasit akhir-akhir ini

menyebabkan kurang mempannya penggunaan kelompok kuinolin dalam kemoterapi malaria (Biagini *et al*, 2003).

Begitu juga penggunaan artemisinin yang digunakan untuk terapi multidrug resisten *P. falciparum* terbatas karena daya larutnya yang rendah dalam air maupun minyak, sehingga dibuat senyawa-senyawa derivatnya secara semi sintesis yang tetap membutuhkan artemisinin sebagai bahan dasar. Analog-analog peroxide sintesis juga telah dibuat seperti 1,2,4-trioxane, fenozan BO-7, dispiro tetraoxane dan arteflene (Biagini *et al*, 2003; Olliaro and Taylor, 2004).

2.2.2. Tinjauan tentang antimalaria dari bahan alam

Penelitian terhadap bahan alam dalam usaha menemukan senyawa baru antimalaria dilakukan secara intensif oleh beberapa peneliti di dunia pada dasawarsa terakhir ini. Banyak molekul baru hasil isolasi dari bahan alam yang telah dikaji aktivitas antiplasmodialnya. Sebagian besar molekul baru ini merupakan metabolit sekunder dalam tanaman yang termasuk dalam golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid, xanton, naftoquinon dan lainnya.

a. Golongan alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa basa nitrogen organik yang terdapat dalam tumbuhan telah lama dikenal mempunyai berbagai aktivitas farmakologi termasuk antimalaria kuinin. Kuinin merupakan antimalaria alami yang sudah lama dikenal. Beberapa alkaloid baru yang mempunyai aktivitas sebagai antimalaria telah berhasil diisolasi dari beberapa tanaman misalnya bisbenzilisouinolin dan naftiisouinolin.

Beberapa senyawa bisbenzilisokuinolin yang telah diteliti diantaranya tetrandrin, isotetrandrin, barbamin, funiferin, obamegin, piknamin, talisopidin dan dapnolin mempunyai IC_{50} di bawah 1 μM terhadap strain *P. falciparum* multiresisten.

Alkaloid golongan naftiisoquinolin juga terbukti mempunyai khasiat sebagai antimalaria. Dionkopolin B dan dionkopolin A yang berasal dari *Tryphophyllum peltatum* mempunyai aktivitas antimalaria dengan nilai IC_{50} berkisar antara 0,02 -0,33 g/ml. Lebih lanjut dilaporkan juga bahwa dionkopolin C mempunyai aktivitas antiplasmodial *in vitro* pada *P. falciparum* ($IC_{50} = 0,01 \mu g/ml$).

b. Golongan terpenoid

Beberapa senyawa yang termasuk golongan terpenoid seperti quasinoid dan sesquiterpen lakton hasil isolasi dari berbagai tanaman telah banyak dibuktikan mempunyai aktivitas antiplasmodial.

Beberapa quasinoid antara lain ailantinon, brusatol, bruseantin, bruseantanol, brusein A, brusein B, brusein C dan brusein C memiliki aktivitas yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} dalam skala ng/ml.

Sesquiterpen lakton, salah satu golongan terpenoid yang berhasil diisolasi dari beberapa spesies tanaman, juga telah dibuktikan mempunyai aktivitas antiplasmodial terhadap strain *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin. Bahkan salah satu diantaranya yaitu artemisinin telah digunakan dalam klinik sebagai antimalaria pilihan untuk melawan *P. falciparum* yang multiresisten.

c. Golongan xanton dan flavonoid

Senyawa turunan xanton yang diisolasi dari ekstrak etanol tanaman *Garcinia dulcis* terbukti memiliki aktivitas sebagai antiplasmodial. Dua diantara turunan xanton tersebut adalah 1-O-metilsimfoxanton dan garciniaxanton yang mempunyai aktivitas lebih baik dari pirimetamin, tetapi lebih rendah dibandingkan klorokuin. Garciniaxanton memiliki nilai IC_{50} 0,96 $\mu\text{g/ml}$ terhadap pertumbuhan *P. falciparum*.

Senyawa flavonoid yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* didapatkan memiliki aktivitas terhadap *P. falciparum*, tetapi menunjukkan efek potensiasi dengan artemisinin. Beberapa laporan terbaru mengenai aktivitas flavonoid sebagai antimalaria diantaranya exiguaflavon A dan exiguaflavon B dari tanaman *Artemisia indica* (Mustofa, 2003; Saxena *et al*, 2003). Tiga senyawa flavanon yang diisolasi dari akar tanaman *Sophora flavescens*, yaitu 2'-metoksikurarinon, sophoraflavanon dan kuraninon memiliki aktivitas antimalaria moderat terhadap *P. falciparum* FCR-3 dengan IC_{50} masing-masing 2,4 μM , 2,6 μM dan 2,1 μM (Kim, 2004). Senyawa likokalkon A yang diisolasi dari akar dan rimpang berbagai spesies *Glycyrrhiza* L. memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* 3D7 dengan IC_{50} 2,1 $\mu\text{g/ml}$ (Ziegler, 2004).

2.2.3. Kasus resistensi obat antimalaria

Perkembangan problem malaria secara global menjadi semakin besar disebabkan karena resistensi parasit, sehingga mengurangi aktivitas dan kemampuan obat-obat antimalaria (*limited armamentarium of antimalaria drugs*) (Biagini *et al*, 2003).

Parasit telah mengembangkan banyak cara untuk mengatasi toksisitas obat yaitu dengan mutasi pada gen target, berkurangnya akumulasi obat dan inaktivasi obat. Rendahnya akumulasi obat misalnya, menyebabkan lebih sedikit obat yang dapat mencapai target .

Perkembangan resistensi pada obat-obat malaria lapis pertama (*first line antimalaria compound*) yang digunakan dalam pencegahan dan pengobatan malaria di dasawarsa terakhir ini merupakan problem utama dalam penanggulangan malaria. *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin telah ditemukan di seluruh bagian negara tropis di dunia, yaitu Afrika Timur, Pasifik Barat, Asia Barat, Asia Tenggara dan sekitarnya, termasuk Bangladesh, Butan, India, Myanmar dan Thailand (Krettli *et al*, 2001; WHO, 2003).

Di lima dekade terakhir ini resistensi obat terhadap *P. falciparum* menjadi suatu issue yang sangat penting. WHO, (1973) dalam Noedl (2003) mendefinisikan resistensi obat (*drug resistance*) sebagai kemampuan dari suatu strain parasit untuk *survive* dan tetap mengalami multiplikasi meskipun diberikan obat dan mengabsorpsi dalam dosis yang lebih besar dari dosis yang biasanya diberikan tanpa adanya toleransi dari parasit.

Di Indonesia sendiri, *P. falciparum* resisten klorokuin telah ditemukan di 12 propinsi pada 14 kabupaten yaitu Propinsi Nangrauh Aceh Darusalam, Lampung, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, Kalimantan Barat, Nusa Tenggara Timur, Papua, Maluku, Maluku Utara dan DKI Jakarta. *P. falciparum* yang resisten klorokuin pertama kali ditemukan pada tahun 1974 di Kalimantan Timur dan terus meluas ke

beberapa wilayah. Hal ini karena mobilitas penduduk antar wilayah yang semakin meningkat sehingga malaria tidak dapat segera diberantas di suatu wilayah. Faktor lain yang juga berpengaruh yaitu tidak dipatuhinya minum obat sesuai aturan. Resistensi parasit terhadap obat-obat antimalaria ini menyebabkan kesulitan dalam program kontrol malaria di Indonesia (DepKes, 2004).

Penelitian awal menunjukkan bahwa resistensi terjadi melalui beberapa mekanisme yang berbeda, termasuk adanya perubahan pada transpor obat atau target enzim yang mengakibatkan penurunan afinitas ikatan obat dengan inhibitor. Sejak dipelajarinya parasitologi molekuler pada tahun 1980, telah diperoleh kemajuan untuk memahami mekanisme resistensi dari obat antimalaria yang paling banyak digunakan yaitu kuinolon analog dan antifolat. Target obat tersebut, tidak mempan lagi untuk membunuh parasit malaria dan cenderung menimbulkan resistensi parasit.

Resistensi parasit terhadap klorokuin pertama kali dilaporkan di Dakar tahun 1988. Resistensi parasit terhadap klorokuin misalnya, diketahui disebabkan oleh adanya mutasi pada gen *pfmdr1* yang mengkode P- glikoprotein homolog (Pgh1). Diduga terjadi juga mutasi pada gen-gen yang tidak teridentifikasi yang melengkapi terjadinya resistensi ini (Rosenthal *et al.*, 2001; Daily *et al.*, 2003; Burke *et al.*, 2003). Resistensi fansidar (kelompok antifolat) dihubungkan dengan mutasi pada enzim yang ditargetkan oleh sulfadoxin dan pirimetamin. Sedangkan resistensi klorokuin dihubungkan dengan mutasi pada suatu transporter yang ditemukan dalam vakuola makanan parasit (*chloroquin*

resistance transporter=CRT), transporter lain dalam vakuola makanan yaitu *multi-drug resistance gene 1 (MDR1)*, *pfcr1* gen dan mekanisme yang belum diketahui (Wiser, 2003, Daily, 2003).

2.3 Parasit Malaria

2.3.1 Siklus hidup parasit malaria

Malaria adalah penyakit akut dan kronis yang disebabkan oleh parasit bersel tunggal yang tergolong dalam protozoa obligat intraseluler dari genus *Plasmodium*. Dikenal ada 4 spesies yang menyebabkan malaria pada manusia yaitu *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* dan *P. ovale*. Parasit ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk betina dari jenis *Anopheles*. Diantara keempat spesies tersebut *P. falciparum* yang paling berbahaya sebagai penyebab infeksi akut dan berat bahkan berakibat fatal.

Siklus hidup *Plasmodium* terdiri dua fase, yaitu fase seksual (*sporogony*) yang berkembang dan memperbanyak diri dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina dan fase aseksual (skizogoni) mengalami perbanyakan pada hospes manusia yang terdiri dari dua bagian yaitu skizogoni pada sel hati (*pre-erythrocytic schizogony=liver stage*) atau fase jaringan dan skizogoni dalam sel darah merah (*erythrocytic schizogony= blood stage*) atau fase eritrositik (Gambar 2.1.)

dengan enzim proteolisis, selanjutnya membentuk shizont (9). Merozoit tumbuh dari shizont dewasa yang juga disebut segmenter (10) kemudian merozoit-merozoit menginfeksi eritrosit (11); merozoit menginvasi eritrosit dan melakukan replikasi kembali lagi dari awal (6-11); trofozoit dan shizont pada eritrosit terinfeksi dapat ditemukan masuk ke sirkulasi peripheral pada infeksi *P. falciparum*. Eritrosit yang terinfeksi dapat terjadi pada organ-organ vital seperti otak, jantung dan paru-paru. Bila terjadi di otak menyebabkan malaria serebral. Sebagai alternatif pada siklus replikasi aseksual, parasit dapat berdeferensiasi ke dalam bentuk seksual sebagai makro atau mikrogametosit (12). Gametosit-gametosit akan masuk ke dalam tubuh nyamuk saat nyamuk mengisap darah host dan terjadi proses gametogenesis. Bentuk mikrogamet mengalami proses exflagelasi (13), dan menghasilkan bentuk makrogamet (14) kemudian terbentuk zigot (15). Zigot berkembang menjadi ookinet yang motil (16) Kemudian mengadakan penetrasi pada lambung nyamuk menjadi oocyst (17). Oocyst mengalami replikasi aseksual (18) memproduksi sporozoit-sporozoit (19). Sporozoit masuk ke dalam hemocoel (*body cavity*) nyamuk (20). Selanjutnya sporozoit bermigrasi ke kelenjar ludah (*salivary glands*) dan terjadinya suatu siklus yang lengkap (Wiser, 2001).

2.3.2 Parasit Malaria Intraeritrosit

Invasi Plasmodium ke dalam host umumnya melalui mekanisme yang sama yaitu adanya reseptor parasit yang terikat pada eritrosit (*receptor-ligand interaction*) dan selanjutnya melalui tahap-tahap *reorientation apical, junction*

terjadinya reinvasi ke eritrosit baru dengan mengadakan replikasi membentuk sekitar 32 merozoit baru.

Parasit malaria pada fase eritrositik terletak di dalam lingkungan intrasetuler yang melindungi mereka dari serangan imunologik. Tetapi kondisi ini juga memisahkan mereka dari suplai nutrisi yang terdapat dalam sirkulasi darah. Oleh karena itu parasit mengembangkan mekanisme baru untuk membawa dan mendapatkan nutrisi dari sitosol eritrosit. Pada fase intraeritrosit ini Plasmodium menggunakan eritrosit sebagai sumber nutrient yang dapat dikonsumsi dengan cepat dalam waktu singkat. Hemoglobin dari sitosol eritrosit dibawa ke dalam vakuola makanan dan akan didegradasi secara proteolitik. Degradasi hemoglobin merupakan suatu proses metabolisme sebagai sentral pertumbuhan dan maturasi parasit malaria (Banerjee, 2002). Sejak fase tropik, kandungan RNA parasit meningkat dan sejak proses tersebut replikasi DNA menjadi 8-32 kali lipat. Pertumbuhan parasit secara cepat ini juga, meningkatkan kebutuhan asam amino yang akan digunakan dalam proses sintesis protein (Wiser, 2001).

Sumber-sumber asam amino untuk kebutuhan parasit diperoleh dengan proses mencernakan hemoglobin host dan *up take* asam amino bebas. Eritrosit dari sitosol dibawa masuk ke dalam vakuola makanan yang bersifat asam (*acidic food vacuola*) dan selanjutnya akan dipecah menjadi globin dan heme. Globin akan dihidrolisis menjadi asam-asam amino bebas (*free amino acid*) yang digunakan untuk proses sintesis protein parasit. Hemoglobin menyediakan sebagian besar dari asam amino yang dibutuhkan parasit untuk

melangsungkan proses sintesis protein. Hemoglobin juga menyediakan kebutuhan besi (Fe) untuk parasit. Proses pemecahan hemoglobin dalam jumlah besar menimbulkan konsekuensi bagi parasit karena akan menghasilkan heme bebas yang bersifat toksik dalam konsentrasi yang signifikan. Karena itu parasit harus mengubahnya menjadi pigmen hemozoin yang tidak toksik. Tahap-tahap awal degradasi hemoglobin oleh parasit malaria belum diketahui secara jelas (Gamboa and Rosenthal 1996; Sherman, 1998; Wiser, 2001).

Sel darah merah yang terinfeksi parasit menunjukkan metabolisme yang berbeda dengan adanya perubahan-perubahan drastis secara fisiologi. Pada parasit yang dewasa utilisasi glukosa dan produksi asam laktat oleh sel parasit lebih 100 kali dibandingkan eritrosit normal yang tidak terinfeksi parasit. Menurut Ziegler, (2001) sejak fase intraeritrositik, parasit malaria akan mendegradasi lebih dari 75% hemoglobin dari sel eritrosit yang terinfeksi.

2.3.3. Degradasi hemoglobin dalam vakuola makanan

Sejak 48 jam invasi *Plasmodium* ke dalam eritrosit, terjadi degradasi hemoglobin sekitar 80% dari sel induk diuraikan menjadi asam amino, sebagian digunakan untuk sintesa protein parasit. Proses biogenesis degradasi hemoglobin diawali dengan pembentukan formasi double-membran pada transport vesikel (*transport vesicle*) oleh sitostom sel host secara pinositosis yaitu bagian dalam (*inner*) merupakan membran plasma parasit (*parasite plasma membrane*) dan bagian luar (*outer*) dari vesikel transport adalah *parasitophorous vacuolar membrane*

(PVM). Selanjutnya hemoglobin diangkut transport vesikel ke vakuola makanan sebagai suatu "organel seperti lisosom" (*lysosome-like organelle*) yang kaya oksigen dan mengalami fusi dalam vakuola makanan parasit malaria. Di dalam vakuola makanan beberapa enzim protease berperan pada hidrolisis hemoglobin menjadi fragmen peptida kecil, dan ini merupakan target obat-obat antimalaria (Hempelman *et al*, 2003; Rathore *et al*, 2006).

Vakuola makanan *Plasmodium* memiliki kurang lebih tiga jenis enzim protease yaitu aspartik protease (Plasmepsin), sistein protease (falcipain) dan metallo protease (falsilysin). Ketiga enzim ini terlibat dalam proses hidrolisis hemoglobin menjadi globin yang selanjutnya menjadi peptida (oligo peptidase) dan heme. Proses inisiasi pemecahan hemoglobin oleh plasmepsin I dan diduga juga peran falsipain-2 menjadi hemoglobin tetramer. Selanjutnya falcipain yang dikode oleh 4 genom yang berbeda akan melanjutkan pemecahan pada bagian yang lain dari protein. Falcipain-2 dan falsipain-3, 66,6-93% teridentifikasi pada daerah kataliknya di vakuola makanan *P. falciparum* pada stadium parasit yang berbeda dan aktif pada pH asam. Falcipain-2 terekspresi pada trophozoit awal sedangkan falcipain-3 terekspresi pada trophozoit akhir (fase yang lebih dewasa). Falsilysin mengubah oligo peptida menjadi peptida kecil tersebut yang selanjutnya menjadi 20 asam amino oleh aminopeptidase. Proses proteolitik maksimal terjadi pada fase trophozoit diikuti dengan shizont dan cincin (Sherman, 1998; Banerjee *et al*, 2002; Ridley, 2002; Wisner, 2003; Sijwali *et al*, 2004). Bagan proses degradasi hemoglobin dalam vakuola makanan parasit malaria sebagai berikut:

Beberapa inhibitor pada proses degradasi hemoglobin dapat menyebabkan proses tersebut menjadi terganggu. Secara morfologi hambatan inhibitor pada proses degradasi hemoglobin menyebabkan pembengkakan pada vakuola makanan dan vakuola makanan berwarna gelap. Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE terhadap akumulasi globin dapat ditunjukkan dengan adanya pita yang berwarna hitam pada posisi 16 kDa (Rosenthal *et al*, 1991; Sherman *et al*, 1998).

2.3.4. Detoksifikasi heme parasit malaria

Proses pengambilan dan penguraian hemoglobin dari eritrosit yang terinfeksi parasit menimbulkan konsekuensi yang merugikan bagi parasit.

Hemoglobin yang mengalami proteolisis akan menghasilkan asam amino dan juga heme bebas (Fe(III)PPIX). Dalam kaitan ini terjadilah keseimbangan pembentukan asam amino dan mencegah efek heme bebas. Heme bebas bersifat toksik bagi parasit dan mempunyai kemampuan untuk melisis membran parasit malaria serta dapat menghambat aktivitas beberapa enzim. Oleh karena itu parasit malaria mengembangkan mekanisme detoksifikasi heme. Mekanisme detoksifikasi heme yang telah teridentifikasi yaitu : 1). mengubah heme bebas menjadi hemozoin atau pigment malaria, secara spontan (biokristalisasi) 2). Degradasi yang difasilitasi oleh hidrogen peroksida di dalam vakuola makanan, 3). Degradasi glutathione-dependent yang terjadi dalam sitoplasma parasit, 4). Kemungkinan terjadi oksigenasi heme ditemukan pada *P. berghei* (parasit rodent) dan *P. knowlesi* (parasit simian) tetapi tidak terjadi pada *P. falciparum*. Detoksifikasi heme menjadi hemozoin sebagai suatu proses

biokristalisasi merupakan mekanisme utama (*major mekanisme*) yang terjadi pada parasit malaria (Sherman, 1998; Ziegler, 2001; Auparakkitanon, 2003; Tekwani, 2005). Proses ini merupakan target penting pengembangan obat antimalaria (Goldie, 1990; Hempelmann, 1994; Birago, 1998; Francis, 1997; Kurosawa, 2000; Fidock, 2004).

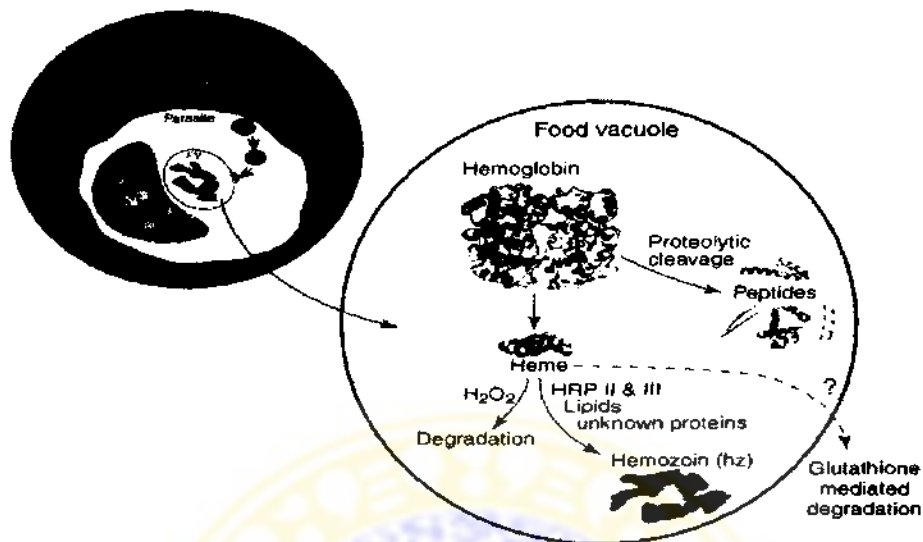
Analisis dengan spektroskopik dan kristalografi X-ray mengindikasikan bahwa struktur hemozoin sama dengan β -hematin. β -hematin merupakan bentuk dimer dari heme dengan ikatan kovalen reciprocal antara kelompok asam karboksilik pada cincin protoporphyrin-IX dan atom-atom Fe (Wiser, 2004; Rathore, 2006). Bentuk-bentuk dimer tersebut berinteraksi secara langsung dengan ikatan hidrogen membentuk kristal hemozoin sehingga formasi pigmen dideskripsikan sebagai suatu proses biokristalisasi atau biomineralisasi (Hempelmann, 2002; Hempelmann, 2003; Wiser, 2004). Mekanisme pembentukan formasi hemozoin belum banyak diketahui, tetapi *histine-rich protein 2 (PfHRP2)* parasit malaria dan lipid-lipid diduga ikut terlibat sebagai inisiator dalam proses polimerisasi heme tersebut. *Histine-rich protein 2 (PfHRP2) P. falciparum* merupakan inisiator pada proses polimerisasi heme dan produk degradasi hemoglobin dan promotor pada degradasi heme yang menghasilkan H_2O_2 pada vakuola makanan parasit malaria (Wiser, 2004; Rathore, 2006).

Selanjutnya bentuk ferro (Fe^{2+} -PPIX) dalam vakuola makanan dengan pelepasan elektron berubah menjadi bentuk ferri (Fe^{3+} -PPIX) menghasilkan anion superoksida yang akan diprotek oleh enzim-enzim antioksidan seperti

superoksida dimustase dan glutathion reduktase pada sitosol parasit malaria (Wiser, 2003).

Proses detoksifikasi heme ini dapat terjadi juga di sitosol parasit melalui peran hidrogen peroksida dan degradasi yang dimediasi oleh glutathion. Berhubungan dengan Glutathion-dependent, diketahui bahwa dalam eritrosit lintasan pentosa posfat berperan untuk menyediakan NADPH untuk mereduksi glutathion teroksidasi (GSSG) menjadi glutathion tereduksi (GSH) yang dikatalis oleh enzim glutathion reduktase. Glutathion tereduksi (GSH) inilah yang berperan mengoksidasi hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O yang dikatalis oleh enzim glutathion peroksidase suatu enzim yang mengandung selenium (Platel, 1999; Auparakkitanon, 2003).

Egan (2002) melaporkan hasil analisis kimiawi dengan elektron mikroskop dan dilaporkan bahwa trophozoit *P.falciparum* terdiri dari $61 \pm 2\%$ Fe, dalam eritrosit yang mana $92 \pm 6\%$ berlokasi pada vakuola makanan, $88 \pm 9\%$ ada dalam bentuk hemozoin. Menurut Wiser, (2004) proses sintesis hemozoin dan proses degradasi hemoglobin berlangsung secara simultan dengan mengkonversi 25-50% heme bebas menjadi hemozoin. Selanjutnya dijelaskan juga bahwa lebih dari 95% besi (Fe) bebas dihasilkan sejak pengambilan hemoglobin ditemukan dalam hemozoin. Menurut Rathore *et al*, (2006) proses detoksifikasi heme dilakukan dengan pengambilan hemoglobin melalui invaginasi sitostomal secara pinositosis dari sitosol host. Transpor vesikel kemudian mentransfer hemoglobin ke vakuola makanan. Skema proses detoksifikasi heme secara umum terlihat Gambar 2.4. di bawah ini.



Gambar 2.4. Skema pengambilan hemoglobin dan proses detoksifikasi heme pada parasit malaria (Rathore *et al*, 2006).

2.4 Tanaman Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng)

2.4.1 Klasifikasi tanaman

- Divisi : Spermatophyta
- Sub Divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Sub Kelas : Monocolhamydeae
- Bangsa : Urticales
- Suku : Moraceae
- Marga : *Artocarpus*
- Jenis : *Artocarpus champeden* Spreng (Backer & Van Den Brink, 1965; Van Steenis, 1978).
- Sinonim : *Artocarpus polyphema* Pers. (Heyne, 1987)

2.4.2 Deskripsi tanaman

- Habitus** : Pohon berumah satu, tinggi 10-20 m, liar atau ditanam, berbuah pada Juli sampai September.
- Batang** : Membulat dengan banyak getah yang rekat.
- Daun** : Helaihan daun eliptis sampai memanjang atau bulat telur terbalik 10-25 x 5-10 cm dengan tangkai 1-3 cm, terdapat banyak trikoma pada bagian tulang daun, pangkal pendek yang menyempit, tepi rata, serupa kulit, dari atas mengkilat, hijau tua. Daun penumpu bulat telur memanjang.
- Bunga** : Karangan bunga jantan atau betina. Bulir betina berbentuk gada memanjang, bunga tenggelam pada poros, bagian yang bebas panjangnya ± 3 mm, pada ujung yang berpori muncul kepala putik yang tunggal serupa cacing. Bulir jantan silindris hijau pucat atau kekuningan, bunga sangat kecil dengan tenda bunga pendek bertajuk dua yang pipih pada ujungnya dan satu benang sari.
- Buah** : Buah semu kerap kali pada cabang, silindris memanjang, bau menusuk, bertonjolan ringan, tonjolan piramidal, segi 4-7, daging sekeliling biji, serupa puding lendir.
- Biji** : Biji panjangnya 2-3 cm, diliputi oleh semacam lapisan daging biji berwarna kuning tua, lembut, tipis, mengandung banyak air dan terasa manis (Van Steenis, 1978; Morton, 1987).

merupakan senyawa fenol terbesar yang terdapat dalam tumbuhan ini dan telah diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis dan farmakologis.

Tanaman ini mengandung senyawa flavonoid yang diberi nama artokarpin, heteroflavanon-A dan siklocampedol bersama-sama dengan empat senyawa triterpen, yaitu sikloeukalenol, glutinol, sikloartenon, dan 24-metilensikloartanon, serta suatu sterol, sitosterol (Hakim, 1998).

Isolasi dan determinasi struktur beberapa senyawa baru flavon terisoprenilasi dari *A. champeden* Spreng juga telah dilaporkan yaitu artoindonesianin A dan B (Syah, 2002) dan artoindonesianin M (Syah, 2002).

Kandungan senyawa lain yang telah dilaporkan juga yaitu dua senyawa flavon terisoprenilasi, artoindonesianin U (1) dan V (2) yang diisolasi dari kayu tanaman *A. champeden*, bersama dengan tiga senyawa yang telah diketahui yaitu 5'-hydroxycudraflavone A, cyclocommunin dan artonin B. Senyawa 1 dan 2 menunjukkan aktivitas toksik yang kuat terhadap P-388 *cell lines* (Syah, 2004).

Menurut Achmad (2004), bahwa *A. champeden* Spreng mengandung suatu campuran yang kompleks dari beberapa jenis flavonoid yang dapat disusun menjadi 7 jenis berdasarkan kerangka karbon yang berlainan yaitu jenis : Flavonon, flavon, 3-prenilflavon, piranoflavon, oksepinoflavon, dihidrobenzosanton dan furanodihidrobenzosanton. Jenis-jenis senyawa ini adalah homogen dan mempunyai ciri khas dalam arti mengandung satu unit isoprenil yang terikat pada atom C-3 dan teroksidasi pada posisi 2' 4' atau posisi-2'4'5' pada cincin B dari kerangka flavon. Secara biogenesis kerangka-karbon ini berasal dari 3- penilflavon yang berturut-turut mengalami

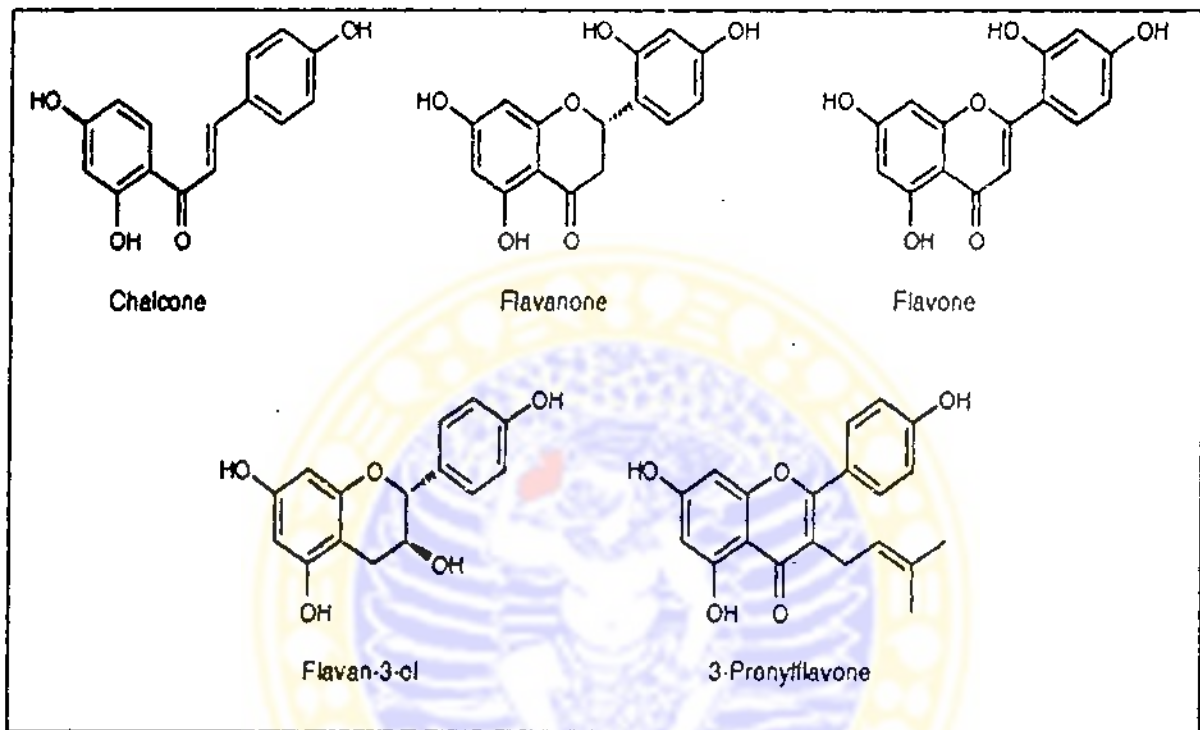
siklisasi yang melibatkan substituen isoprenil yang terikat pada C-3 dan cincin B (Achmad, 2004).

Menurut Achmad (2004), tanaman cempedak (*A. champeden* Spreng.) mengandung beberapa jenis flavonoid yang dapat dikelompokkan menjadi tujuh macam (Gambar 2.1), yaitu :

- Flavanon** : Artokarpanon, Artoindonesianin E dan Heteroflavanon A
- Flavon** : Norartocarpetin
- 3-prenilflavon** : Artokarpin, Kudraflavon C, Artoindonesianin Q, Artoindonesianin R, Artoindonesianin U dan Heterofilin
- Oksepinoflavon** : Artoindonesianin B, Artonin A, Chaplashin
- Piranoflavon** : Siklokomunol, Siklokomunin, Sikloartokarpin, Siklocampedol atau Artoindonesianin
- Dihidrobensosanton** : Artoindonesianin T, Artoindonesianin S, Artoindonesianin V
- Furanodihidrobensosanton** : Artoindonesianin A, Artoindonesianin M.

Menurut Hakim (2006), senyawa-senyawa fenol dari *Artocarpus Artocarpus* terdiri dari flavonoid terisoprenilasi, stilbene dan 2-arylbenzofuran. Identifikasi selanjutnya berdasarkan kerangka dasar flavonoid diklasifikasikan yaitu khalkon, flavanon, flavon, flavan-3-ol, dan 3-isoprenilflavon (Gambar 2.6). Kelas-kelas lain yang termasuk dalam struktur flavon yang mengalami modifikasi dimana bentuknya berupa derivat siklik seperti 3-

prenylflavon yang memiliki bentuk 2',4'-dioksigenasi atau 2',4',5'-trioksigenasi pada cincin B yaitu oxepinoflavon, piranoflavon, dihydrobenzoxanthon, furanodihydrobenzoxanthon .



Gambar 2.6. Kelompok flavonoid pada *A. champeden* Spreng. (Hakim, 2006).

Jenis-jenis senyawa ini adalah homogen dan mempunyai ciri khas dalam arti mengandung satu unit isoprenil yang terikat pada atom C₃ dan teroksigenasi pada posisi 2'4' atau posisi 2'4'5' pada cincin B dari kerangka flavon. Secara biogenesis, kerangka-kerangka karbon ini berasal dari 3-prenilflavon yang berturut-turut mengalami siklisasi yang melibatkan substituen isoprenil yang terikat pada C₃ dan cincin B. Struktur molekul yang demikian merupakan ciri

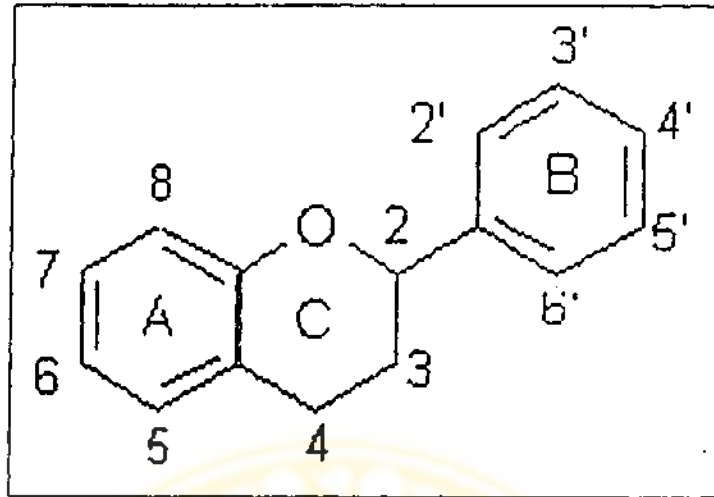
khas senyawa-senyawa 3-prenilflavon dan merupakan indikator kemotaksonomi dari famili Moraceae (Achmad, 2004).

2.5 Senyawa Flavonoid dan Aktivitas antimalaria

2.5.1 Senyawa flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang ditemukan di alam dalam jumlah besar, terutama pada tanaman tingkat tinggi dan banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran, teh, anggur dan bir (Rodriquez-Proteau, 2006). Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Senyawa ini dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikock dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol oleh karena itu warnanya berubah bila ditambah basa dan amonia, jadi lebih mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonyugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak antara lain panjang gelombang maksimum utama antosianin pada 475-560 nm dan panjang gelombang maksimum tambahan pada 275 nm. Khalkon pada panjang gelombang maksimum 365- 390 nm dan panjang gelombang maksimum tambahan pada 240-260 nm. Flavanon dan flavanonol pada panjang gelombang maksimum 27-279 nm dan panjang gelombang maksimum tambahan pada 310-330 nm (Harborne, 1996).

Senyawa-senyawa golongan flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon C_{15} dengan susunan $C_6-C_3-C_6$ dimana gugus aril (C_6) terikat pada suatu rantai propan C_3 yang digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.7. Struktur dasar Flavonoid. Cincin A dan cincin B dihubungkan dengan 3 atom karbon ("three-carbon bridge") (Ganora, 2002).

Menurut Robinson (1995), kerangka senyawa flavonoid terdiri atas dua gugus C_6 (cincin benzena tersubsitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Kelas-kelas yang berlainan dalam kelompok ini dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan. Golongan terbesar flavonoid umumnya mempunyai cincin piran yang menghubungkan rantai tiga-karbon dengan salah satu dari cincin benzena.

Flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula sehingga flavonoid merupakan senyawa polar dan umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetil sulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air dan lain-lain. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid

lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida (Markham, 1981).

2.5. 2. Aktivitas antimalaria senyawa flavonoid

Aktivitas farmakologik dari senyawa flavonoid telah banyak dipelajari, dan diketahui bahwa senyawa ini menunjukkan aktivitas biologi yang luas aktivitas seperti efek hipotensif, efek sitotoksitas, anti tumor, antikanker, antioksidan, antimalaria. Penelitian Durgo (2007) menggunakan sel karsinoma laringeal pada manusia dilaporkan bahwa flavon (kuersetin, fisetin, dan myricetin), flavonol (luteolin) dan flavanone glikositas (naringin), memiliki kemampuan antara lain : menghambat dehidrogenase mitokondria sebagai indikator efek sitotoksik, berpengaruh pada level glutathione, mempunyai efek antioksidan, dan mempengaruhi permeabilitas membran.

Penelitian terhadap senyawa flavonoid tanaman *Artemisia annua* terutama dari ekstrak kloroform yaitu metoksilasi artemitin, chrysopenetin, chrysopenol-D dan cirsilincol memiliki aktivitas antimalaria *in vitro* dengan IC_{50} sebesar $2,4-6,5 \times 10^{-5}$ M. Hasil ini terlihat bahwa aktivitas flavonoid pada *A.annua* juga potensial sebagai antimalaria bila dibandingkan dengan IC_{50} artemisinin (sesquiterpen lacton dari ekstrak heksana) yaitu 3×10^{-8} M terhadap *P. falciparum* (Chen Liu , 1992).

Brandao (1997), melaporkan adanya aktivitas antimalaria *in vitro* tanaman *Bidens pilosa* dan spesies *Bidens* (Asteraceae) yang lain. Aktivitas ini berkaitan dengan adanya kandungan senyawa acetylen dan flavonoid. Ekstrak etanol (daun dan akar) dan fraksi kloroform dan butanol dengan konsentrasi 50 µg/ml

dapat menghambat 90% *P. falciparum*. Percobaan secara *in vivo* paada mencit menyebabkan hambatan terhadap pertumbuhan *P. berghei*.

Selanjutnya Boonlaksiri (2000), melaporkan bahwa senyawa flavonoid (stilbene terprenilasi) dari *A. integer* mempunyai aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P. falciparum*.

Senyawa-senyawa flavonoid seperti 7,3'-O-dimethylquercetin, dan 7-O-methyluteolin yang diisolasi dari daun *Rhus retunorrhoea* Steud, diketahui mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* (W2 Clone) dengan IC₅₀ 0,98 µg/ml dan IC₅₀ 2,8 µg/ml terhadap *P. falciparum* (W6 Clon) (Ahmed , 2001).

Penelitian terhadap tanaman *Bidens pilosa* yang digunakan di Brasil untuk pengobatan malaria, diketahui bahwa ekstrak 80% etanol dan fraksinya aktif secara menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*. Aktivitas tersebut disebabkan adanya senyawa golongan fiovonoid (Oliveira, 2004).

Penelitian terhadap tanaman hop (*Humulus lupulus* L.) famili Cannabinaceae diketahui bahwa tanaman ini mengandung senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid terutama kalkon terprenilasi. Pengujian *in vitro* terhadap tujuh derivat khalkon diketahui memiliki efek terhadap proses degradasi hemin (Frolich, 2006), antimutagenik, antioksidasi, aktivitas kemopreventif pada kanker (Miranda, 2000).

Aktivitas flavonoid juga dilaporkan pada penelitian yang dilakukan terhadap tanaman *A. annua*. Tanaman ini dikenal sebagai bahan dasar obat malaria artemisinin dengan kandungan sesquiterpen lakton yang aktif terhadap obat-obat resisten terhadap *P. falciparum*. Hasil penelitian terhadap beberapa senyawa

flavonoid tanaman ini diketahui bahwa flavonoid dapat meningkatkan reaksi artemisinin terhadap hemin, dan memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* yang potensial (Bilia, 2006).

Selanjutnya untuk suatu isolat yang poten sebagai obat antimalaria yaitu apabila nilai IC_{50} nya $< 1-5 \mu M$ untuk uji *in vitro*, dan $< 5-25$ mg/kg BB pada *in vivo* (Fidock, 2004).

2.6. Tinjauan Tentang Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam

Kata "ekstraksi" berasal dari bahasa Latin "extractio" atau "extrahere" yang berarti "menarik-keluar". Yang 'ditarik-keluar' adalah senyawa-senyawa kimia (misalnya senyawa aktif) dari jaringan tumbuhan atau hewan. Untuk menarik keluar senyawa-senyawa tersebut dapat dilakukan dengan cara penyarian, pemerasan, atau destilasi. Bahan baku alami berupa tumbuhan atau hewan biasanya susunannya kompleks dan tidak tunggal. Bahan aktifnya sendiri ada yang larut dalam satu atau lebih pelarut, sehingga dalam pengerjaannya harus selalu dipertimbangkan pemilihan pelarut yang tepat, sehingga dapat melarutkan dan menarik keluar bahan aktif tersebut (Iskandar, 2000).

Dalam bahan baku tumbuhan atau hewan terkandung berbagai zat atau senyawa lain yang dapat mengganggu dalam mendapatkan suatu bahan aktif yang diinginkan. Bahan-bahan seperti gula, pati, gom, lendir, pektin, lemak dan selulosa mungkin ada yang tidak diperlukan, tetapi tidak jarang justru bahan-bahan tersebut yang terekstraksi. Dengan demikian tujuan ekstraksi adalah menarik keluar bahan yang diperlukan saja, atau apabila bahan-bahan yang

tidak diperlukan ikut terekstraksi, maka harus dilakukan tahapan berikutnya, yaitu isolasi bahan yang dikehendaki saja.

Ekstraksi suatu bahan tanaman tergantung pada tekstur dan kandungan air dan bahan tersebut dan juga pada jenis senyawa yang akan diisolasi. Biasanya sebelum melakukan ekstraksi, diperlukan suatu perlakuan awal terhadap bahan tersebut untuk mencegah terjadinya reaksi oksidasi enzimatik atau hidrolisis yang dapat merusak atau mengubah senyawa-senyawa yang terkandung dalam bahan tersebut. Hal ini bisa dilakukan dengan cara merendam bahan segar dalam alkohol mendidih, atau dapat juga dikeringkan secepat-cepatnya dengan bantuan aliran udara, tanpa menggunakan suhu tinggi (Harborne, 1987).

Untuk memperoleh kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering biasanya dilakukan ekstraksi-sinambung serbuk bahan menggunakan sederetan pelarut secara berganti-ganti, umumnya menggunakan pelarut-pelarut dari yang kurang polar sedikit demi sedikit meningkat sampai yang paling polar. Ekstraksi yang berdasarkan pada perbedaan kepolaran senyawa kandungan ini berguna untuk telaah profil fitokimia dari suatu tumbuhan sebelum dilakukan kromatografi atau pemisahan selanjutnya. Pemisahan dan pemurnian senyawa (isolasi) lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan berbagai metode kromatografi yang cocok, antara lain kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (Harborne, 1987).

sephadex, polivinil pirolidon, dan campuran dua atau lebih bahan di atas. Kecepatan KLT disebabkan oleh sifat adsorben yang lebih padat bila disapukan pada pelat penyangga. Kecepatan KLT ini sangat menguntungkan dalam penelaahan senyawa-senyawa yang sifatnya labil. KLT juga merupakan metode yang peka sehingga bila diperlukan dapat dipakai untuk memisahkan bahan yang jumlahnya kecil sampai ukuran mikrogram (Harborne, 1996).

2.6.2. Kromatografi kolom

Pada kromatografi kolom dibutuhkan kolom pemisah berupa suatu tabung yang diisi dengan bahan pengadsorpsi (silika gel, selulosa, poliamida, gel sephadex) dan pelarut pengembang. Sampel dilarutkan dalam sesedikit mungkin pelarut, ditempatkan di bagian atas kemasan kolom, dan kemudian dieluasi. Pelarut untuk melarutkan sampel sama dengan pelarut yang pertama kali akan digunakan untuk mengeluasi. Sampel yang kurang larut atau berbentuk kental dapat disiapkan dengan melapiskannya terlebih dahulu pada sejumlah kecil adsorben. Selanjutnya dilakukan eluasi dengan pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan untuk mengeluasi pada kromatografi kolom umumnya merupakan pelarut atau campuran pelarut yang dimulai dari yang kepolarannya rendah dan meningkat ke pelarut atau campuran pelarut yang kepolarannya tinggi (Roth and Blascke, 1988; Markham, 1981).

Dengan menggunakan cara kromatografi kolom, skala pemisahan dapat ditingkatkan hampir ke skala industri (Markham, 1981). Dengan kromatografi kolom, campuran zat-zat kandungan dapat dipisahkan menjadi fraksi-fraksi yang cukup jumlahnya untuk dilakukan berbagai uji aktivitas (Robinson, 1995). Untuk

isolasi, penggunaan cara ini dapat menghasilkan senyawa murni dalam skala gram (Harborne, 1996).

2.7. Tinjauan Spektroskopi

2.7.1. Spektroskopi infra merah

Spektrometri inframerah merupakan salah satu alat yang penting dalam penentuan struktur senyawa organik. Spektrum inframerah memberikan gambaran mengenai gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam suatu molekul.

Inti-inti atom yang terikat oleh ikatan kovalen mengalami getaran atau vibrasi. Jika molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan amplitudo vibrasi atom-atom yang terikat itu. Jadi molekul tersebut berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi. Ikatan antara dua atom dapat mengalami vibrasi ulur atau vibrasi tekuk. Setiap ikatan memerlukan energi tertentu agar berpindah ke keadaan vibrasi tekuk tereksitasi dan sejumlah energi tertentu untuk berpindah ke keadaan vibrasi ulur tereksitasi. Dengan kata lain suatu ikatan akan menyerap energi dengan panjang gelombang tertentu.

Senyawa yang dianalisis dapat dilarutkan dalam kloroform atau CCl_4 , berupa gerusan dalam minyak nujol atau zat dicampur homogen dengan kalium bromida (KBr) kemudian dikompresi sampai terbentuk cakram tipis yang transparan (Harborne, 1987).

Menurut Silverstein (1991), gugus $\text{C}=\text{O}$ terdapat pada daerah serapan $1820\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, $\text{C}=\text{C}$ aromatik pada 1650 cm^{-1} , $\text{O}-\text{H}$ pada $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, dan $\text{C}-\text{H}$ aromatik pada daerah $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$.

proton-proton dalam suatu molekul mempunyai lingkungan kimia dan magnetik yang berlainan. Karena medan magnet yang sebenarnya dialami oleh setiap proton adalah gabungan antara H_0 dan medan magnet molekul imbasan, maka untuk beresonansi diperlukan energi (radio frekuensi) yang berbeda-beda, sehingga dapat diperoleh suatu spektrum (Rudyanto, 2004).

2.8. Tinjauan Densitometri

Densitometri adalah analisis instrumental berdasarkan interaksi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada KLT. Walaupun dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, densitometri lebih dititikberatkan pada analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil, yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan menggunakan KLT (Mulja, 1995). Untuk analisis kualitatif, kromatogram yang dihasilkan adalah spektrum gelombang. Apabila panjang gelombang maksimum pembanding sama dengan panjang gelombang maksimum sampel, kemungkinan zat tersebut adalah sama.

2.9. Studi ultrastruktur parasit malaria dan skrining obat baru

Studi ultrastruktur dengan menggunakan mikroskop elektron merupakan salah metode untuk mengamati secara detail proses biokimiawi pada mahluk hidup dan problem biologi. Menurut Bozzola and Russell (1998), pengamatan dengan elektron mikroskop dapat menunjukkan pengaruh yang terjadi pada organisasi jaringan khususnya pada sel. Penggunaan mikroskop elektron juga mampu mengvisualisasikan pembentukan atom dan molekul misalnya bentuk-bentuk molekul DNA. Penggunaan mikroskop elektron telah dimulai pada tahun

1932-an oleh Knoll dan Ruska, pada studi-studi biologi. Pada tahun 1942 Emmel, Jakob, dan Golz menggunakan mikroskop elektron pertama kali pada studi malariologi khususnya pada pengamatan sporozoit dari *Plasmodium vivax* (Aikawa, 1971). Sampai tahun 1970-an maju dengan pesat dalam mendiskripsikan masalah-masalah biologi terutama Penemuan struktur dan komponen sel. Ernst Ruska dan Max Knoll mendapatkan penghargaan pertama dalam pengembangan metode dengan mikroskop elektron. Ruska mendapatkan hadiah nobel di bidang Fisika pada tahun, 1986.

Preparasi jaringan untuk pengamatan pada mikroskop elektron transmisi merupakan proses yang penting. Setiap tahapan pada proses prosedur yang dilakukan sangat berpengaruh pada kualitas akhir dari gambaran mikroskopis yang akan diamati. Secara umum preparasi sampel untuk mikroskop elektron transmisi terdiri dari 8 (delapan) tahapan utama yaitu: fiksasi awal, pencucian, fiksasi kedua, proses dehidrasi, infiltrasi dengan pelarut transitional, infiltrasi dengan resin (damar), pembuatan blok (*embedding*) dan curing.

Berdasarkan "*Guidelines for antimalarial drug screening*", tahap pertama dalam proses skrining obat baru adalah evaluasi aktivitas *in vitro* calon obat baru. Skrining obat merupakan penerapan paling penting dari pengujian yang dilakukan secara *in vitro*. Dibandingkan dengan model malaria *rodent* (mamalia *Rodentia*) *in vivo*, pengujian *in vitro* mempunyai beberapa keuntungan sebagai berikut, yaitu penggunaan spesies parasit malaria yang sama dengan spesies yang menginfeksi manusia, adanya kemungkinan untuk menguji beberapa senyawa secara bersamaan dan dengan konsentrasi yang tinggi, hanya

memerlukan obat dalam jumlah kecil (terutama untuk isolat dari tanaman maupun obat yang sukar disintesis) serta mekanisme kerja obat yang dapat dipantau. Skrining pengujian *in vitro* juga mempunyai kerugian, antara lain kurangnya informasi mengenai metabolisme obat, farmakokinetik dan toksisitas obat (Trager and Jensen 1976 ; Fidock *et al* , 2004).

2.10. Sodium dodesil sulfat - poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE)

Protein dapat dipisahkan dan dimurnikan berdasarkan komponen, ukuran dan kelarutannya yang berbeda-beda. Protein juga dapat dipisahkan berdasarkan ikatan proteinnya yaitu ikatan peptida.

Metode yang paling sering digunakan untuk pemisahan protein adalah metode elektroforesis. Elektroforesis berasal dari kata "*electro*" yang menunjukkan energi elektrik yang digunakan. Sedangkan kata "*phoresis*" berasal dari bahasa Yunani yang artinya membawa (*to carry across*). Elektroforesis adalah suatu gerakan partikel koloid yang bermuatan listrik melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik (Aulanni'am, 2004).

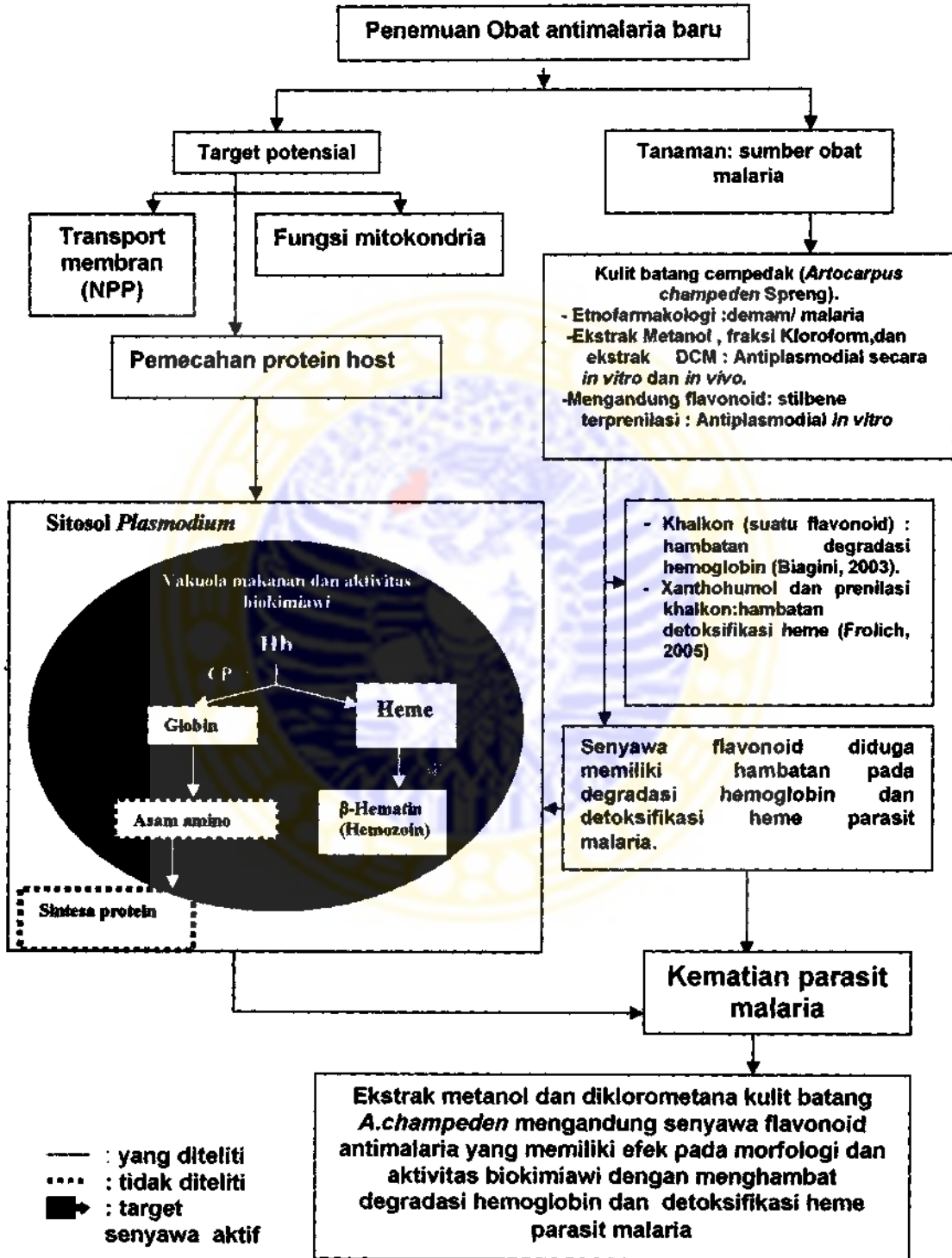
Metode elektroforesis yang paling sering digunakan adalah Sodium dodesil sulfat- poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE). Sodium Dodesil Sulfat (SDS) berfungsi sebagai detergen anionik yang akan melindungi protein dari denaturasi pada saat pemanasan. Denaturasi disebabkan oleh pecahnya ikatan disulfida yang akan tereduksi menjadi gugus-gugus sulfhidril.

Gel poliakrilamid dapat dibentuk melalui ikatan silang rantai poliakrilamid. Rantai poliakrilamid terbentuk dari polimerisasi monomer-monomer akrilamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) menjadi rantai poliakrilamid yang panjang. Proses

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1. Skema Kerangka Konseptual Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual diatas dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Resistensi dari obat-obatan antimalaria yang ada sekarang ini terhadap *P. falciparum* sangat mengkhawatirkan, karena resistensi parasit menyebabkan berkurangnya aktivitas obat antimalaria (Biagini , 2003).
2. Belum berhasilnya upaya untuk menemukan vaksin malaria yang ideal, maka aktivitas riset yang bertujuan untuk mengidentifikasi target intervensi kemoterapi dan penemuan obat baru menjadi sarana utama dalam upaya penanggulangan malaria.
3. Tanaman *A. champeden* Spreng (suku Moraceae) telah digunakan sebagai malaria, disentri dan penyakit kulit (Heyne.1987; Iwasaki and Ogata,1995).
4. Ekstrak diklorometana, metanol dan fraksi kloroform kulit batang *A.champeden* memiliki senyawa aktif yang bersifat antiplasmodial secara *in vitro* maupun *in vivo*.
5. Penelitian yang telah dilakukan Hakim *et al* (1998), menunjukkan bahwa kulit batang cempedak mengandung senyawa utama golongan flavonoid dan terpenoid. Senyawa stilbene terpenilasi suatu flavonoid dari famili Moraceae telah dilaporkan mempunyai aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P.falciparum* (Boonlaksiri- *et al*, 2000). Senyawa flavonoid yang diisolasi dari *A.champeden* juga memiliki aktivitas antimalaria (Widyawaruyanti *et al*, 2007).

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dan untuk mencapai tujuan penelitian ini, maka telah dilakukan tahapan penelitian sebagai berikut :

4.1.1. Ekstraksi dan dan fraksinasi kulit batang *A. champeden*

Ekstraksi serbuk kulit batang *A. champeden* dilakukan dengan cara maserasi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, diklorometana dan dilanjutkan dengan pelarut metanol.

4.1. 2. Uji aktivitas antimalaria *in vitro* hasil fraksinasi ekstrak metanol

a. Persiapan kultur parasit

Parasit *P. falciparum* yang digunakan dalam penelitian ini dikultivasi dengan metode Trager and Jensen (1976).

b. Persiapan bahan uji

Bahan uji berupa fraksi dari ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* dilarutkan dalam DMSO. Kemudian dilakukan serial pengenceran dengan medium sampai diperoleh 5 konsentrasi bahan uji : 100; 10; 1; 0,1; 0,01 μ g/ml

c. Uji aktivitas antimalaria

Uji aktivitas antimalaria *in vitro* dilakukan pada lempeng multi titer datar dengan 24 lubang. Pengujian dilakukan pada kultur parasit dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5% menggunakan duplikasi percobaan.

4.1.3. Isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak metanol *A. champeden*

- a. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis preparatif
- b. Identifikasi isolat dengan Kromatografi lapis Tipis
- c. Identifikasi isolat dengan Spektrometer RMI- $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (Resonansi Magnetik Inti) : Spektra Proton, Spektra Karbon, Spektra COSY, Spektra HMBC, Spektra HMQC
- d. Identifikasi isolat dengan spektrometer HRFAB-MS
- e. Identifikasi isolat dengan spektrometer FTIR

4.1.4. Uji aktivitas antimalaria *in vitro* dari isolat hasil isolasi ekstrak metanol.

a. Persiapan kultur parasit

Parasit *P. falciparum* yang digunakan dalam penelitian ini dikultivasi dengan metode Trager & Jensen (1976).

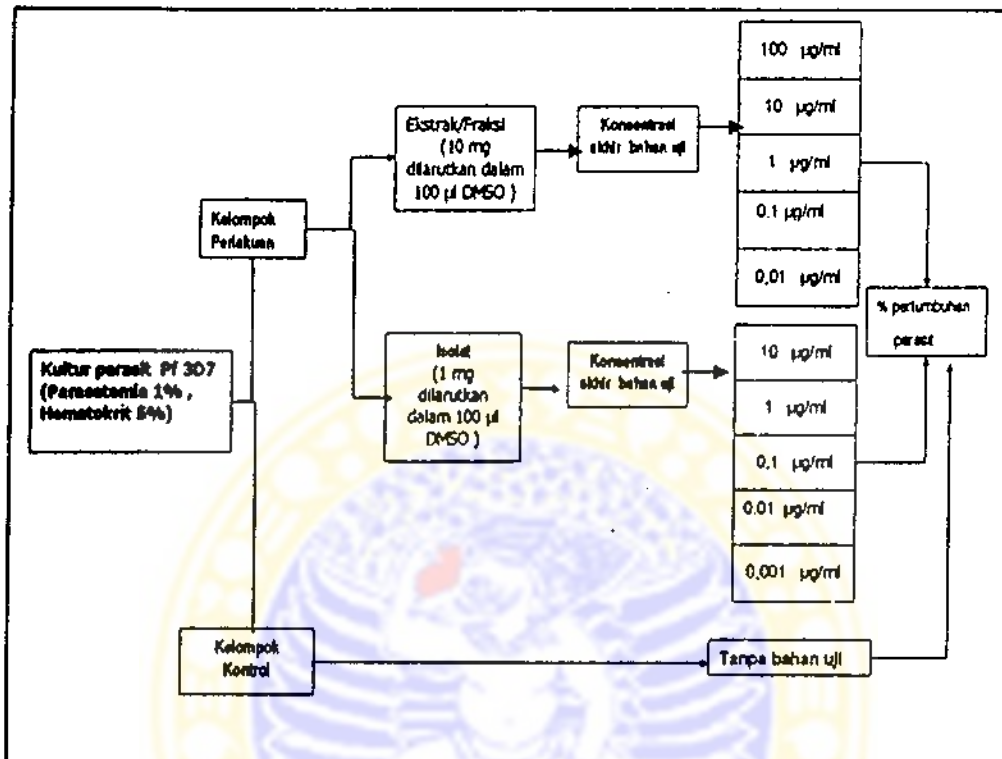
b. Persiapan bahan uji

Bahan uji berupa isolat dari ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* dilarutkan dalam DMSO. Kemudian dilakukan serial pengenceran dengan medium sampai diperoleh 5 konsentrasi bahan uji : 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 $\mu\text{g/ml}$

c. Uji aktivitas antimalaria

Uji aktivitas antimalaria *in vitro* dilakukan pada lempeng multi titer datar dengan 24 lubang. Pengujian dilakukan pada kultur parasit dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5% dengan duplikasi percobaan. Rancangan penelitian pada uji antimalaria *in vitro* baik

terhadap ekstrak, fraksi maupun isolat dapat digambarkan pada Gambar 4.1. sebagai berikut:

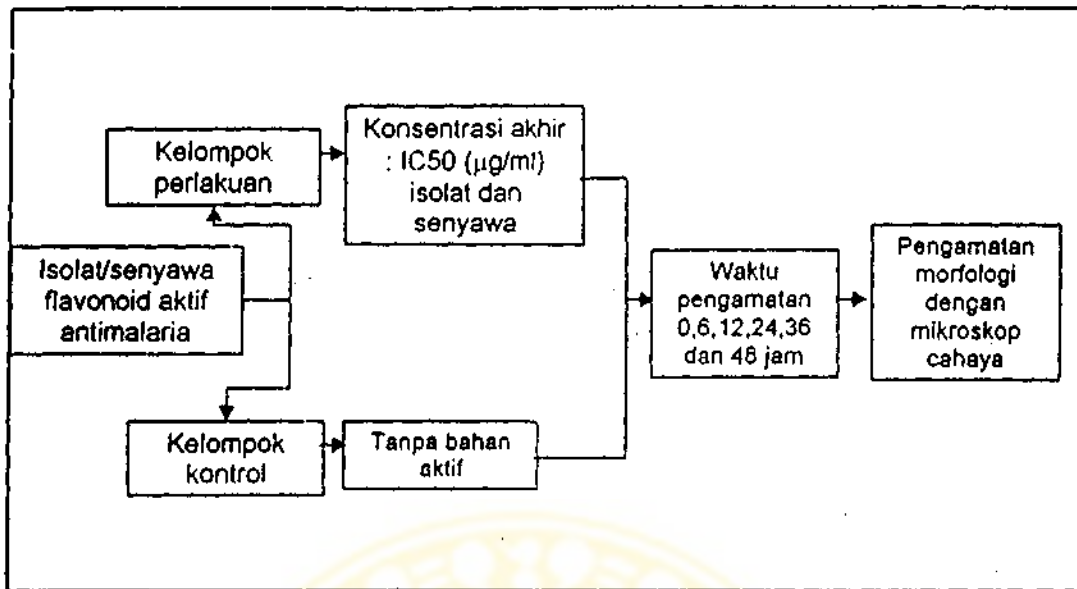


Gambar 4.1. Rancangan penelitian uji antimalaria *in vitro*

4.1.5. Uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria pada morfologi parasit malaria

a. Pengamatan dengan mikroskop cahaya

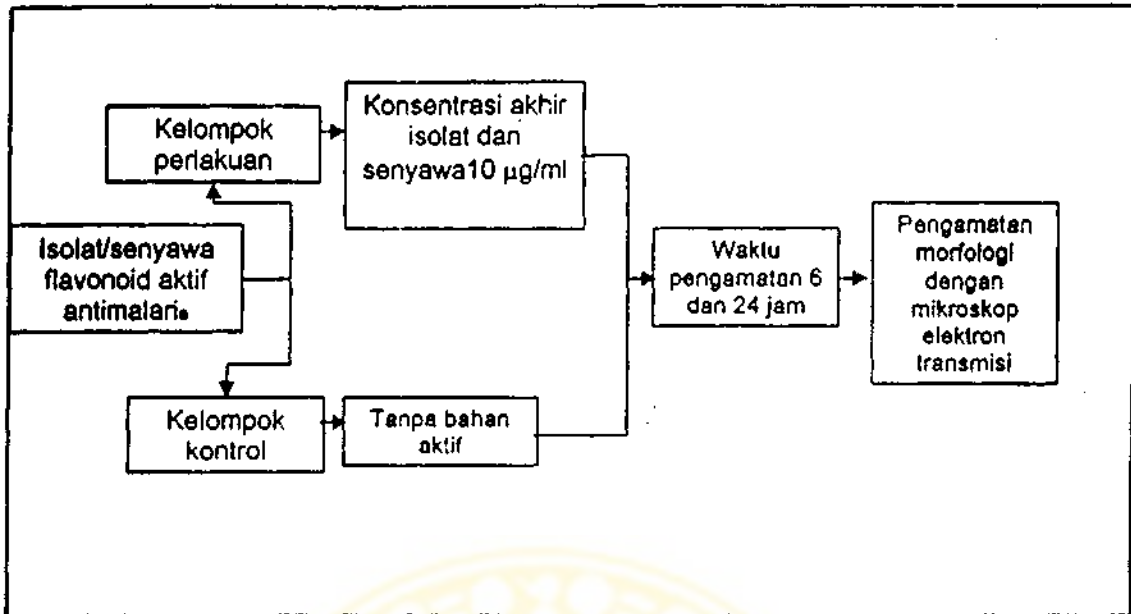
Uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria pada morfologi parasit malaria, yang diamati dengan mikroskop cahaya, dilakukan secara *in vitro*. Pengujian dilakukan menggunakan *P.falciparum* strain 3D7 pada lempeng multititer datar dengan 6 lubang (*well*) menggunakan kultur parasit dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5%. Pengamatan kondisi morfologi dilakukan pada masa inkubasi 0, 6, 12, 24, 36 dan 48 jam. Rancangan penelitian pada pengujian terhadap isolat dan senyawa aktif dapat digambarkan pada Gambar 4.2. sebagai berikut:



Gambar 4.2. Rancangan penelitian uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria terhadap pada morfologi parasit malaria menggunakan mikroskop cahaya

a. Pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi

Uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria pada morfologi vakuola makanan parasit malaria, yang diamati dengan mikroskop elektron transmisi, dilakukan secara *in vitro*. Pengujian dilakukan menggunakan *P. falciparum* strain 3D7 pada lempeng multi titer datar dengan 6 lubang (*well*) menggunakan kultur parasit dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5%. Pengamatan ultrastruktur parasit dilakukan pada masa inkubasi 6 dan 24 jam. Rancangan penelitian pada pengujian terhadap isolat dan senyawa aktif dapat digambarkan pada Gambar 4.3 sebagai berikut:

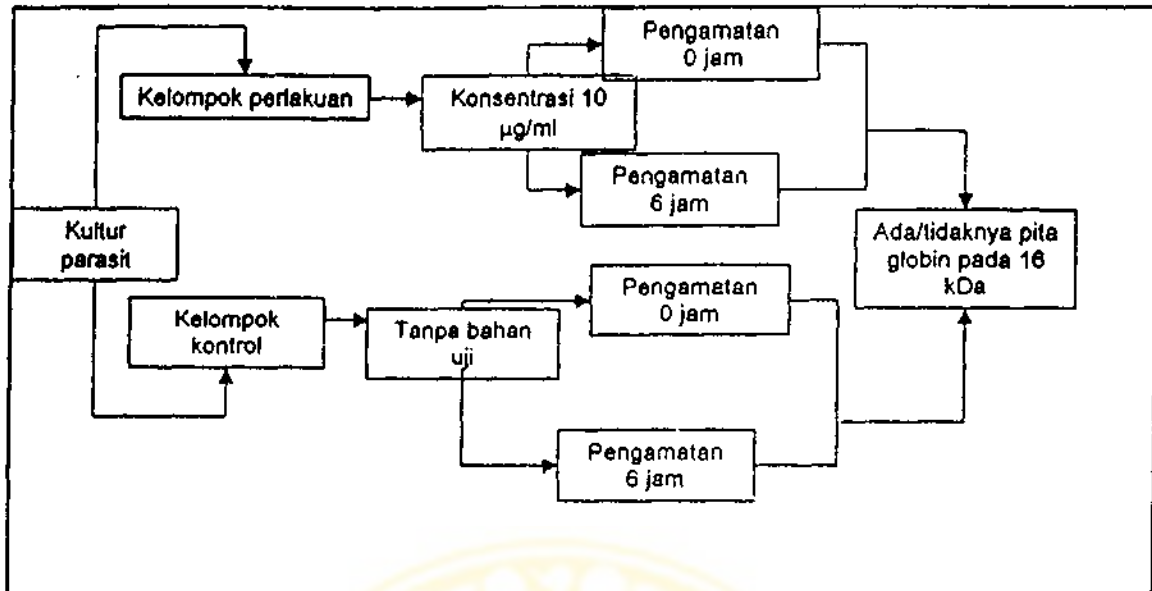


Gambar 4.3. Rancangan penelitian uji efek isolat dan senyawa aktif antimalaria pada morfologi vakuola makanan parasit menggunakan mikroskop elektron transmisi .

4.1.6. Uji efek isolat flavonoid aktif antimalaria terhadap aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan parasit malaria

a. Uji hambatan degradasi hemoglobin (Pandey *et al*, 1999).

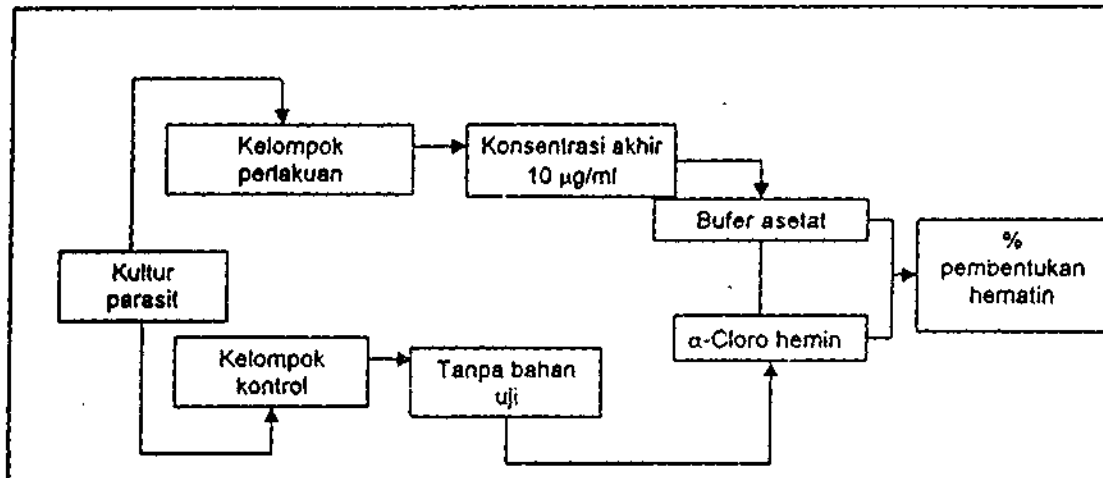
Pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan suspensi *P. berghei* yang berasal dari mencit dengan parasitemia kurang lebih 20% dan hematokrit 4%. Eksperimen dilakukan dengan duplikasi percobaan. Rancangan penelitian terlihat pada Gambar 4.4 di bawah ini :



Gambar 4.4. Rancangan penelitian uji degradasi hemoglobin secara *in vitro*

4.1.7. Uji hambatan detoksifikasi heme sintetis (β -Hematin Inhibition Assay=BHIA) (Tekwani *et al*, 2005).

Hambatan proses detoksifikasi heme dilakukan dengan pengujian hambatan β -hematin secara sintetis (*in vitro*). Senyawa flavonoid aktif antimalaria dari kulit batang *A. champeden* (konsentrasi akhir 10 $\mu\text{g/ml}$) diinkubasi dalam bufer asetat dengan larutan α -chlorohemin (Sigma) selama 24 jam, dengan duplikasi percobaan. Rancangan penelitian terlihat pada Gambar 4.5. di bawah ini :



Gambar 4.5. Rancangan penelitian uji hambatan β -hematin sintesis.

Dari data persen hambatan β -hematin untuk masing-masing senyawa aktif kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan Anava satu arah (*one way Anava*) dan dilanjutkan dengan uji Tukey apabila terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol negatif.

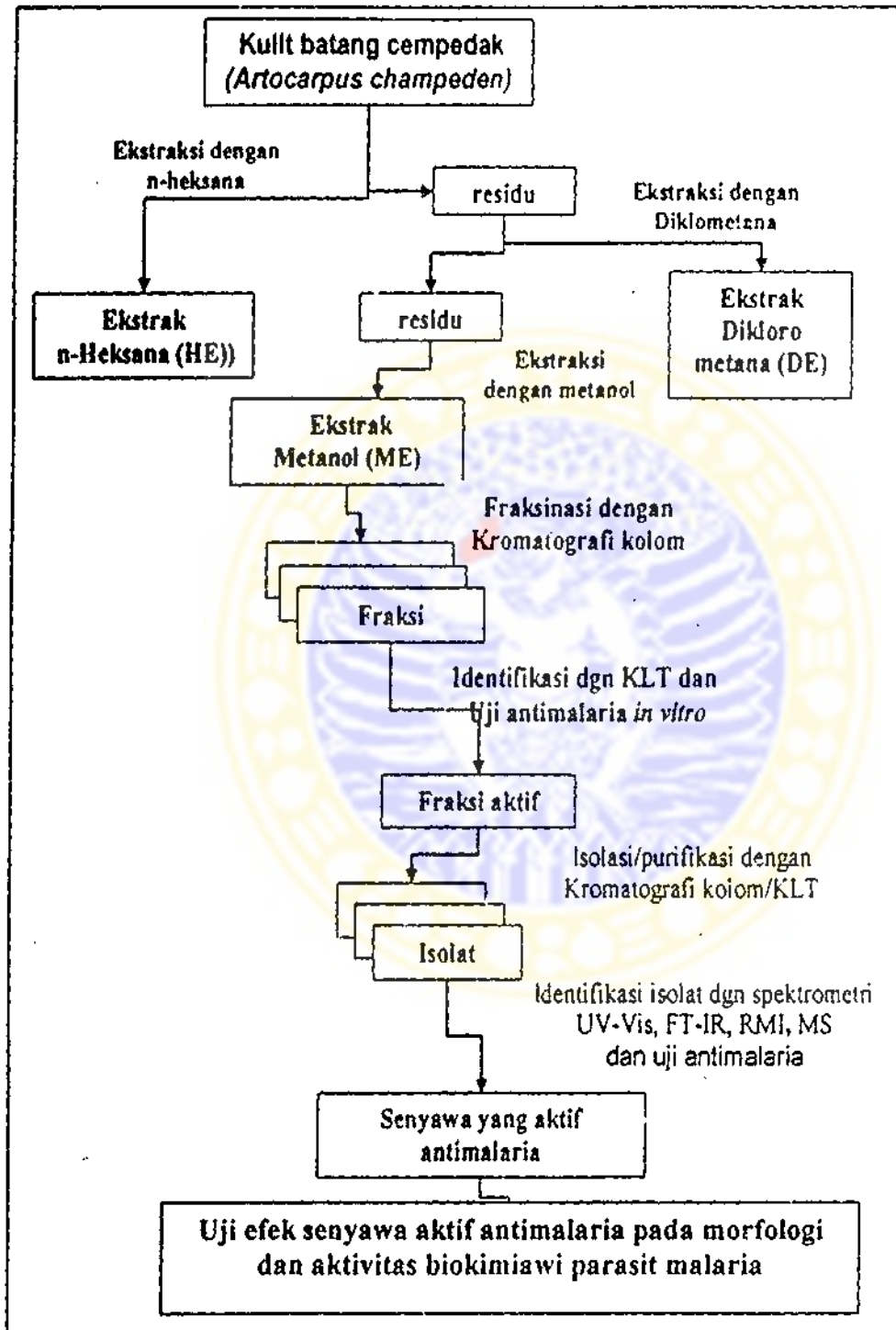
4.1.8. Uji hambatan detoksifikasi heme secara ultrastruktur.

Pengujian hambatan detoksifikasi heme pada *P. falciparum* 3D7 yang diberikan senyawa aktif antimalaria dari kulit batang *A. champeden* dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ dilakukan secara *in vitro* menggunakan lempeng mikrotiter datar dengan 24 sumur. Inkubasi parasit dilakukan selama 6 dan 24 jam, dengan duplikasi percobaan. Rancangan penelitian seperti terlihat pada Gambar 4.3.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yaitu : fraksi, isolat dan senyawa aktif dari ekstrak metanol dan ekstrak diklorometana kulit batang cempedak

(*A. champeden* Spreng). Secara umum skema rancangan penelitian sebagai berikut (Gambar 4.6):



Gambar 4.6. Skema rancangan penelitian

4.3. Variabel penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas yaitu : Konsentrasi dari fraksi, isolat dan senyawa aktif dari kulit batang cempedak (*A. champeden*)

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung, yaitu :

1. Persentase parasitemia (pada uji aktivitas antimalaria *in vitro*)
2. Persen pembentukan β -hematin (pada uji hambatan β -hematin)

4.4. Definisi Operasional

1. Persen parasitemia : jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dalam 5000 eritrosit dalam persen (%)
2. Hambatan pertumbuhan parasit : bila terjadi penurunan tingkat parasitemia pada pemberian bahan uji dibandingkan dengan kontrol negatif (tanpa pemberian bahan uji)
3. Persentase β -hematin : β -hematin yang terbentuk pada pemberian bahan uji dibandingkan dengan kontrol negatif (tanpa pemberian bahan uji).

4.5. Bahan Penelitian

4.5.1. Bahan tanaman

Kulit batang cempedak (*A. champeden*) yang diperoleh dari desa Makbalim, distrik Salawati, Kabupaten Sorong, Irian Jaya, pada bulan Agustus 2004 dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bogor, Jawa Barat. Kulit batang cempedak dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka. Setelah kering kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk.

4.5.2. Bahan untuk ekstraksi, fraksinasi dan isolasi senyawa aktif

Larutan n-heksana p.a. (Merck), diklormetana (DCM) p.a. (Merck), metanol p.a. (Merck), asetonitril (Merck), etil asetat p.a. (Merck), kloroform p.a. (Merck), silica gel-60 (mesh 60-230 ASTM) (Merck), larutan penampak noda CeSO_4 dan uap amonia, lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ (Merck, 0.25 dan 0.5 mm), lempeng KLT RP-18 F₂₅₄ (Merck, 0,5mm)

4.5.3. Suspensi parasit

- a. Suspensi parasit *P. falciparum* strain 3D7 yang diperoleh dari Laboratorium Malaria, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta.
- b. Suspensi parasit *P. berghei* strain ANKA diperoleh dari Laboratorium hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

4.5.4. Bahan untuk pemblakan parasit

NaCl (Merck), antikoagulan CPD (*Citrate Phosphate Dextrose*) dengan adenin, RPMI 1640, HEPES buffer, NaHCO_3 , hypoxanthine (Merck), gentamisin sulfat (Sigma), serum dan sel darah manusia tipe O, *aquadest steril for irrigation* (Otsuka), larutan pewarna Giemsa (Merck), minyak imersi.

4.5.5. Bahan untuk uji antimalaria *In vitro*

- a. Isolat beku *P.falciparum* strain 3D7
- b. Medium kultur malaria lengkap (MCM) yaitu : RPMI 1640, HEPES buffer, NaHCO_3 , hypoxanthine (Merck), gentamisin sulfat (Sigma), serum dan sel darah manusia tipe O, *aquadest steril for irrigation* (Otsuka).
- c. Fraksi dan isolat senyawa aktif *A. champeden*, DMSO (Sigma)

4.5.6. Bahan uji hambatan degradasi hemoglobin (SDS-PAGE)

Isolat *P. berghei* strain ANKA, DMSO (*dimethyl sulfoxide*), PBS (*Phosphat-buffered saline*), saponin 0,1 %, SDS-polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer, 15 % acrylamide/bis acrylamide, sample buffer (SDS-PAGE), running buffer (SDS-PAGE), low marker protein (Biorad), larutan perak nitrat, isolat aktif *A. champeden* Spreng.

4.5.7. Bahan uji pengamatan pada mikroskop elektron transmisi (TEM)

Isolat beku *P. falciparum* strain 3D7, glutaraldehid 5%, natrium cacodilat 0,1M, sukrosa 3%, osmium tetroksida 2% dan $K_3Fe(CN)_6$ 2,5% dalam dapar Natrium cacodilat + sukrosa 3%, propilenoksida, *spurr's mixture*, uranil asetat 0,8%, *triple lead citrate*, isolat dan senyawa aktif *A. champeden*.

4.5.8. Bahan uji hambatan detoksifikasi heme (metode BHIA= β Haematin Inhibitory Activity)

Natrium asetat 8M, buffer asam asetat (pH 5), DMSO, α -chlorohemin (Sigma), NaOH 0,2 M, isolat dan senyawa aktif *A. champeden*.

4.6. Instrumen Penelitian

4.6.1. Instrumen untuk ekstraksi dan isolasi

Labu erlenmeyer, rotavapor (Buchi R-114 dan Buchi R-153), sentrifuse, timbangan analitik (Denver Instrumen M-220 dan Ohaus 2140), pipet ukur, pipet pasteur, bejana kromatografi (Camag), kolom kromatografi, vial-vial, penyemprot noda, pipa kapiler, lemari asam, lampu UV 254 dan 365 nm, *hair dryer*, densitometer "Camag" TLC Scanner 3

(Cats version 4.06), spektrometer RMI (JEOL JNM-LA400), spektrometer HR-FABMS (JEOL JMS-700T), spektrometer UV-Vis (Perkin-Elmer).

4.6.2. Instrumen untuk pembiakan parasit malaria

Pipet pasteur, *blue tip*, *yellow tip*, *culture tube*, autoclaf, oven, botol laborat (Scott-duran), tabung sentrifuse bertutup (falcon), pipet mikro (socorex dan ependorf), pinset, lampu spiritus, *Laminar Air Flow (LAF / clean bench)*, mikroskop (Olympus CH-20), gelas obyek, *disposable syringe*, lemari pendingin, inkubator, desikator, lilin, penyaring membran ukuran 0,22 μm , sentrifuse dingin, cawan petri, pompa hisap, *stirer*, *water bath*.

4.6.3. Instrumen untuk uji aktivitas biokimiawi vakuola makanan parasit malaria.

SDS-PAGE, inkubator, mikroskop, densitometer "Camag" TLC Scanner 3 (Cats version 4.06), Spektrofotometer, mikroskop elektron transmisi JEOL 1010.

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

- a. Isolasi dan analisis senyawa aktif tanaman dilakukan di laboratorium Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya dan Hoshi University Jepang.
- b. Uji aktivitas antimalaria dan uji aktivitas biokimiawi dilakukan di laboratorium Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair Laboratorium malaria, TDC Universitas Airlangga Surabaya dan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta.
- c. Uji *in vitro* dan kajian ultrastruktur *P.falciparum* dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta.

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Isolasi, fraksinasi dan permurnian senyawa aktif kulit batang *A. champeden* (Mabry et al, 1970; Hakim et al ,2006).

1. Ekstraksi kulit batang cempedak

- a. Serbuk kulit batang cempedak ditimbang 1 kg, kemudian dimaserasi dengan 5 liter n-heksana selama 24 jam dan diulangi 3 kali.
- b. Maserat disaring hingga didapatkan ekstrak cair n-heksana. Pelarut n-heksana diuapkan dengan menggunakan vakum evaporator.
- c. Residu diekstraksi kembali dengan menggunakan cara yang sama memakai pelarut diklorometana.
- d. Pelarut diklorometana diuapkan dengan vakum rotavapor untuk mendapat ekstrak diklorometana (DE).
- e. Residu diekstraksi kembali dengan menggunakan cara yang sama memakai pelarut metanol.
- f. Setelah diperoleh ekstrak metanol, pelarut diuapkan menggunakan vakum evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental dikeringkan dalam lemari asam, didapatkan ekstrak kering metanol (ME).
- g. Terhadap ekstrak HE, DE dan ME dilakukan uji antimalaria. Ekstrak yang mempunyai aktivitas antimalaria yang paling poten dilakukan fraksinasi dan isolasi senyawa aktifnya.

2. Fraksinasi ekstrak aktif

- a. Terhadap ekstrak metanol (ME) dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom cepat (VLC) secara gradien, menggunakan fase gerak kloroform : etilasetat (1:9), kloroform : metanol (9:1) dan metanol (100%) dan fase diam silika gel for TLC .
- b. Selanjutnya terhadap setiap fraksi dilakukan identifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT).
- c. Fraksi yang mempunyai profil kromatogram yang sama kemudian dikumpulkan dan diuji aktivitas antimalarianya.

3. Isolasi senyawa aktif

- a. Terhadap fraksi dari ekstrak metanol (ME) yang mengandung flavonoid dan aktif sebagai antimalaria, kemudian dilakukan pemisahan dengan metode kromatografi kolom terbuka dengan kloroform : metanol (15:1) secara isokratik dan fase diam silika gel for column GF 254.
- b. Kemudian terhadap sub fraksi dilakukan pemisahan dengan preparatif kromatografi lapis tipis (PTLC) menggunakan fase diam silika gel fase normal dan fase gerak kloroform: metanol 10%.
- c. Selanjutnya terhadap sub fraksi yang mengandung flavonoid, dipisahkan kembali menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (PTLC) RP 18, menggunakan fase diam asetronitril : metanol : air (4:1:3). Isolat aktif kemudian dimurnikan dan diidentifikasi

4.8.2. Penentuan struktur dan identifikasi senyawa flavonoid

1. Identifikasi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Identifikasi dengan KLT dilakukan terhadap ekstrak, fraksi dan isolat murni dengan menggunakan :

- fase diam : plate KLT preparatif Rp 18
- fase gerak I : asetonitril- metanol -Air (1:1:1)
- Penampak noda : pereaksi warna serri- sulfat 1 %.

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna orange.

2. Identifikasi dengan metode KCKT (HPLC)

- a. Dilakukan pemilihan komposisi pelarut (asetonitril-metanol-air (3:3:4) yang dapat memberikan pemisahan yang paling baik dengan puncak yang tajam
- b. Cuplikan (hasil fraksinasi maupun isolat murni) dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, diultrasonik selama 2 menit, disaring dengan filter milipore 0,2 mikron.
- c. Identifikasi dengan KCKT dilakukan dengan kolom Licrosorb RP C₁₈ (10 μ m) dengan Prekolom, pada panjang gelombang maksimum 254 nm, rata-rata aliran 1,0 mL/menit, dan detektor (UV-vis Detector Varian 9050).

3. Identifikasi Spektrometri UV-Vis

- a. Identifikasi dengan spektrometri UV-Vis dilakukan terhadap isolat yang sudah dimurnikan.

- b. Cuplikan dilarutkan dalam etanol 95 %. Ditambah 2-4 tetes NaOH 2M. Masukkan ke dalam kuvet, lalu diukur serapan maksimumnya.
 - c. Spektrum UV-Vis dari senyawa flavonoid akan memberikan dua sampai tiga pita serapan dengan dari λ maks berkisar antara 250-400 nm (Pita I : 250-270 nm, Pita II : 270-360 nm, Pita III : 360-400 nm).
- 4. Identifikasi dengan spektrometri inframerah (Silverstein et al,1986)**
- a. Sejumlah kecil bahan digerus sampai homogen dengan kalium bromida bebas air.
 - b. Kemudian dikompresi sampai terbentuk pelet yang transparan.
 - c. Pelet ini dimasukkan ke dalam *sample holder* dan direkam spektrumnya.
- 5. Identifikasi dengan spektrometri RMI (Silverstein et al,1986)**
- a. Kurang lebih 1 mg bahan dilarutkan dalam 0,5 ml $CDCl_3$ dan dimasukkan ke dalam tabung sampel.
 - b. Kedalam larutan tersebut ditambahkan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal.
 - c. Kemudian dimasukkan alat di antara dua kutub magnet dan direkam spektrumnya.

4.8.3. Uji aktivitas antimalaria *in vitro*

1. Persiapan medium tak lengkap (*incomplete medium*)

- a. Dibuat larutan steril yang terdiri dari 10,4 g RPMI-1640, 5,96 g HEPES, 2,1 g natrium bikarbonat, 0,05 g hypoxantin, 0,5 ml gentamycin dan aquabides 960 ml.

- b. Kemudian larutan disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22 μm , dimasukkan dalam botol scot dan disimpan pada suhu 4°C. Ini disebut juga medium pencuci (*washing medium*) dan bila akan digunakan, dimasukkan inkubator suhu 37 °C terlebih dahulu.

2. Persiapan serum

- a. Diambil darah manusia golongan O dan diendapkan selama kira-kira 1 jam.
- b. kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serum diambil dengan pipet pasteur dan diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit.
- c. Penyimpanan pada suhu -20 °C dan bila akan digunakan, dihangatkan pada suhu 37 °C.

3. Persiapan medium lengkap

Medium lengkap adalah medium yang mengandung 10% serum manusia. Medium ini dibuat dengan mencampur medium tak lengkap sebanyak 90 ml dengan 10 ml serum manusia (misalnya pada pembuatan 100 ml medium lengkap). Medium ini digunakan untuk membiakkan *P. falciparum*.

4. Persiapan eritrosit 50%

- a. Darah manusia golongan O yang diberi antikoagulan, dimasukkan dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.

- b. Plasma dipisahkan dan leukosit dibuang. Eritrosit dicuci dengan medium pencuci 1-2 kali volume, disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
- c. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali. Eritrosit yang telah dicuci (bebas dari leukosit) ditambah dengan medium lengkap volume yang sama untuk membuat eritrosit 50% dan disimpan pada suhu 4°C.
- d. Eritrosit yang telah dicuci dapat disimpan pada suhu 4°C dan digunakan tidak lebih dari 3 minggu.

5. Prosedur biakan

Prosedur biakan ini didasarkan pada metode Trager and Jensen (1976). Biakan dilakukan pada cawan petri dan dikerjakan secara aseptik. Parasit *P. falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap kloroquin, diperoleh dari simpanan beku yang di-*thawing* dengan cara berikut ini :

- a. Tabung yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37 °C. Ditambahkan dengan volume yang sama NaCl 3,5% dan dipindahkan ke tabung sentrifus menggunakan mikropipet sambil dicampur perlahan.
 - b. Kultur disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang.
 - c. Endapan disuspensikan dengan 5 ml medium tak lengkap, dicampur perlahan-lahan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang.
- Prosedur ini dilakukan sebanyak dua kali

- d. Setelah endapan dicuci, ditambahkan medium lengkap dan eritrosit 50% dicampur perlahan (hematokrit 5%).
- e. Kultur dipindahkan ke dalam cawan petri, dimasukkan dalam *candle jar* dan selanjutnya disimpan di dalam inkubator yang bersuhu 37°C.
- f. Selanjutnya dilakukan penggantian medium setiap hari. Bila tingkat parasitemianya lebih dari 5% dapat dilakukan sub biakan.

6. Prosedur pengujian

- a. Sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 100 μ l DMSO (sebagai stok). Kemudian diambil 5 μ l zat uji (isolat) dari stok dan ditambahkan medium komplet sampai 250 μ l.
- b. Kemudian diambil 120 μ l larutan isolat, ditambahkan kedalam tiap-tiap sumur (*well*) dari lempeng mikrotiter datar yang telah diberi 1080 μ l medium komplet, (kecuali pada kontrol negatif).
- c. Kemudian dibuat serial dilution sehingga konsentrasi akhir pada sumur mikrotiter adalah 1; 0,1; 0,01 ; 0,001 dan 0,0001 μ g/ml (kultur dibuat duplo).
- d. Sebanyak 100 μ l suspensi parasit dengan kadar parasitemia 1% dan hematokrit 5%, ditambahkan ke dalam tiap-tiap sumur (*well*) mikrotiter datar. Inkubasi dilakukan selama 48 jam. Uji ini dilakukan dengan dua kali replikasi.

7. Penyiapan suspensi sel parasit

Kadar parasitemia suspensi sel untuk uji antiplasmodial *in vitro* adalah 1%. Suspensi sel parasit tersebut dibuat dari biakan *P. falciparum*.

$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - \frac{X_p}{X_k} \times 100$$

Keterangan :

X_p = Parasitemia perlakuan

X_k = Parasitemia kontrol negatif

Analisis data hasil percobaan uji antimalaria sel dari tiap-tiap perlakuan diolah dengan menggunakan analisis IC_{50} ditentukan dengan mengekstrapolasikan % penghambatan rata-rata dengan log dosis menggunakan analisa Probit.

4.8.4. Prosedur uji efek isolat dan senyawa aktif terhadap kondisi morfologi parasit

1. Pengamatan dengan mikroskop cahaya

- a. Kultur *P. falciparum* stadium cincin diinkubasi dengan senyawa aktif (konsentrasi akhir adalah nilai IC_{50} isolat dan senyawa aktif) dengan parasitemia kurang lebih 1% dan 5 % hematokrit.
- b. Kultur parasit dipanen pada jam 0,6,12,24,36 dan 48 jam pada masing-masing konsentrasi.
- c. Selanjutnya dibuat hapusan tipis pada gelas objek dan difiksasi dengan metanol absolut.
- d. Pewarnaan terhadap hapusan tipis parasit dilakukan menggunakan larutan giemsa 10% selama 20 menit.
- e. kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya .

80% selama masing-masing 10 menit, etanol 95% selama 10 menit sebanyak 2 kali dan terakhir dengan etanol absolut selama 20 menit sebanyak 2 kali.

- g. Jaringan kemudian diinfiltrasi dengan propilenoksida dengan cara merendam dalam campuran etanol absolute dengan propilenoksida dengan perbandingan bertingkat dan selanjutnya dengan propilenoksida murni pada suhu ruang selama 30 menit.
- h. Setelah itu jaringan direndam dalam campuran propilenoksida dan larutan Spurr (10 g *vinylcyclophene dioxide resin/VCD resin*, *diglycidyl ether* dalam 4,0 g *polypropylene glycol* DER-736, 26 g *nonenyl succinic anhydrate* (NSA), 0,4 g *dimethylaminoethanol* (DMAE) dengan perbandingan 1:1 pada suhu ruang selama 30 menit.
- i. Setengah volume campuran kemudian dibuang dan diganti oleh larutan Spurr dalam volume yang sama dan jaringan direndam dalam larutan Spurr murni dalam keadaan vakum pada suhu ruang selama 24 jam.
- j. Setelah itu larutan perendam dibuang dan dibersihkan agar tidak ada larutan yang tersisa, kemudian jaringan direndam kembali dengan larutan Spurr murni yang dimasukkan dalam inkubator vakum suhu 70°C selama semalam. Persiapan ini akan menghasilkan blok jaringan dengan konsistensi bahan yang keras.

- k. Setelah itu, sebagian bahan plastik pada permukaan blok dibuang agar jaringan yang akan diperiksa berada tepat di permukaan, kemudian pada permukaan blok dibuat bentuk trapezium.
- l. Hasil potongan kasar diwarnai dengan toluidin biru (*toluidine blue*) untuk mencari bagian yang paling banyak mengandung sel dan permukaan potongan diperhalus dengan menggunakan alat *ultrathin*.
- m. Jaringan dipotong dengan pisau *diamond* setebal 40-55 nm dan dilekatkan pada *grid* yang telah dilapisi *formvar* 5% dalam kloroform dan terdiri dari 200 *mesh*.
- n. Hasil potongan diwarnai dengan uranil asetat dan dilanjutkan *triple lead* kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi JEOL 1010.
- o. Morfologi vakuola makanan parasit *P. falciparum* dalam eritrosit yang telah diberi senyawa uji diamati dan dibandingkan dengan morfologi vakuola makanan *P. falciparum* kontrol negatif (tanpa pemberian senyawa uji).

4.8.5. Prosedur uji degradasi hemoglobin (Pandey et al, 1999).

- a. Hewan uji terinfeksi *P. berghei* strain ANKA dengan parasitemia lebih dari 20% dikumpulkan darahnya dalam tabung berisi antikoagulan ACD steril (1:1) dan disentrifus selama 2 menit pada 2000 rpm.
- b. Cuci dengan medium tak lengkap (*incomplete medium*) dan sentrifuse pada 2000 rpm selama 2 menit (dua kali pencucian).

- c. Tambahkan medium komplet yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak volume yang didapatkan (*equal volume*).
- d. Sel darah merah terinfeksi parasit (IRBC) ditambahkan pada multititer plate yang mengandung senyawa uji sesuai dosis yang dibutuhkan (10 µg/ml).
- e. Selanjutnya untuk pengamatan 0 jam, kultur parasit langsung dipanen.
- f. Inkubasi dilakukan selama 0- 6 jam pada cawan mikrotiter datar yang berisi 24 sumur (*well*) pada suhu 37^o C.
- g. Setelah inkubasi kultur dikumpulkan dan disentrifus untuk memisahkannya dengan medium pada 2000 rpm selama 2 menit.
- h. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS 1 ml pada 2000 rpm, selama 2 menit dan supernatan dibuang.
- i. Tambahkan saponin 0,5 % dalam PBS sebanyak 1 ml (tetap di dalam es) dan disimpan di dalam es selama 5 menit. Sentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatant dibuang.
- j. Pelet yang didapatkan ditambahkan protease inhibitor kombinasi (*protease cock tail*) atau 15 µl PMSF (*Phenylmethylsufoniflouride*). Inkubasi dilakukan selama 10 -20 menit dalam es.
- k. Sentrifuse pada 10.000 rpm, selama 10 menit. Supernatan diambil untuk di lakukan pengukuran konsentrasi protein dengan Bradford.
- l. Kultur kemudian disentrifus 10 menit, 1200 rpm (Sorvall MC 12V Dupont). Pelet kemudian ditambahkan dapar sampel SDS-PAGE dan dididihkan selama 3 menit.
- m. Kemudian disimpan pada suhu -20 °C sebelum pengujian selanjutnya.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi

5.1.1. Ekstraksi Simplisia

Simplisia berupa kulit batang *A. champeden* Spreng. dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, digiling sampai menjadi serbuk kemudian diekstraksi secara berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, diklorometana dan metanol pada temperatur ruang. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah maserasi atau perendaman. Setiap 1 hari (24 jam) rendaman disaring, diambil filtratnya dan ampasnya direndam lagi dengan pelarut baru yang sama. Pada hari ke-3 rendaman disaring, filtratnya diambil, ampasnya dikering-anginkan dan kemudian dimaserasi dengan pelarut berikutnya. Filtrat dari masing-masing pelarut dikumpulkan dan diuapkan sampai kering menggunakan penguap putar dengan penurunan tekanan (rotavapor). Hasil ekstraksi yang telah dilakukan terlihat dalam tabel 5.1. sebagai berikut.

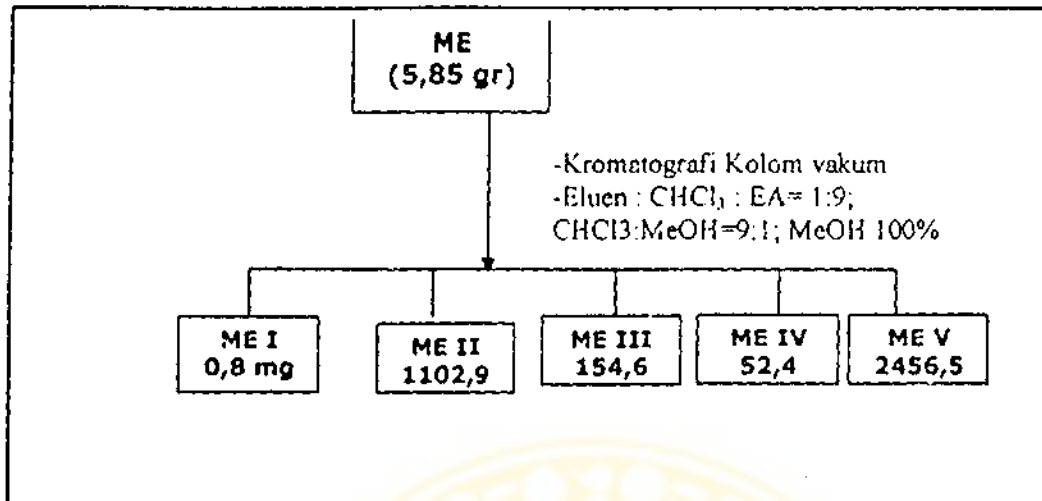
Tabel 5.1. Berat dari masing-masing ekstrak hasil maserasi serbuk kulit batang *A. champeden* Spreng.

Jenis ekstrak	Berat	Warna
Ekstrak Heksana	5,90 gram	Kuning-coklat
Ekstrak Diklormetana	6,60 gram	Coklat kemerahan
Ekstrak metanol	5,85 gram	Coklat kemerahan

Ekstrak metanol kemudian dianalisis dengan KLT menggunakan plate silika gel yang dieluasi dengan pelarut CHCl_3 - EtOAc (9:1). Pada pengamatan di bawah lampu UV 365 nm, terdapat beberapa spot yang berwarna merah, ungu, kuning dan kuning-coklat. Di bawah lampu UV 254 nm, beberapa dari spot-spot tersebut meredam sinar UV dan menjadi berwarna gelap, sementara beberapa spot yang lain menjadi tidak nampak.

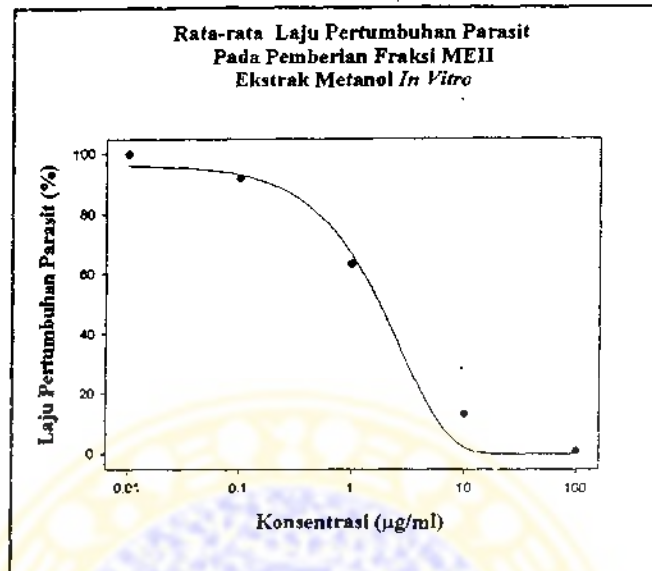
5.1.2. Fraksinasi ekstrak metanol dengan kromatografi kolom vakum (*Vacuum Liquid Chromatografi* =VLC)

Ekstrak metanol sebanyak 5,85 gram, dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom vakum menggunakan fase diam silika gel. Eluasi dilakukan dengan peningkatan kepolaran menggunakan fase gerak I : campuran CHCl_3 -EtOAc (1 : 9) ; fase gerak II : CHCl_3 -MeOH (9:1) dan fase gerak III : MeOH 100%. Eluat ditampung setiap 50 ml secara tetap kecuali jika terdapat pita (*band*) yang cukup terpisah, maka eluat yang mengandung *band* seperti itu ditampung secara tersendiri. Fraksi-fraksi yang terkumpul dari proses kromatografi ini adalah sebanyak 5 fraksi utama, dengan skema pemisahan terlihat pada gambar 5.1. sebagai berikut:



Gambar 5.1. Skema fraksinasi ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A.champeden* Spreng) dengan kromatografi kolom vakum.

Profil KLT dari 5 fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol kulit batang *A.champeden* Spreng yang dilarutkan dengan pelarut metanol, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, fase gerak CHCl₃ : MeOH (9 : 1) dan penampak noda serri sulfat 1% dalam larutan asam sulfat 10%, terlihat pada gambar 5.2 di bawah ini.

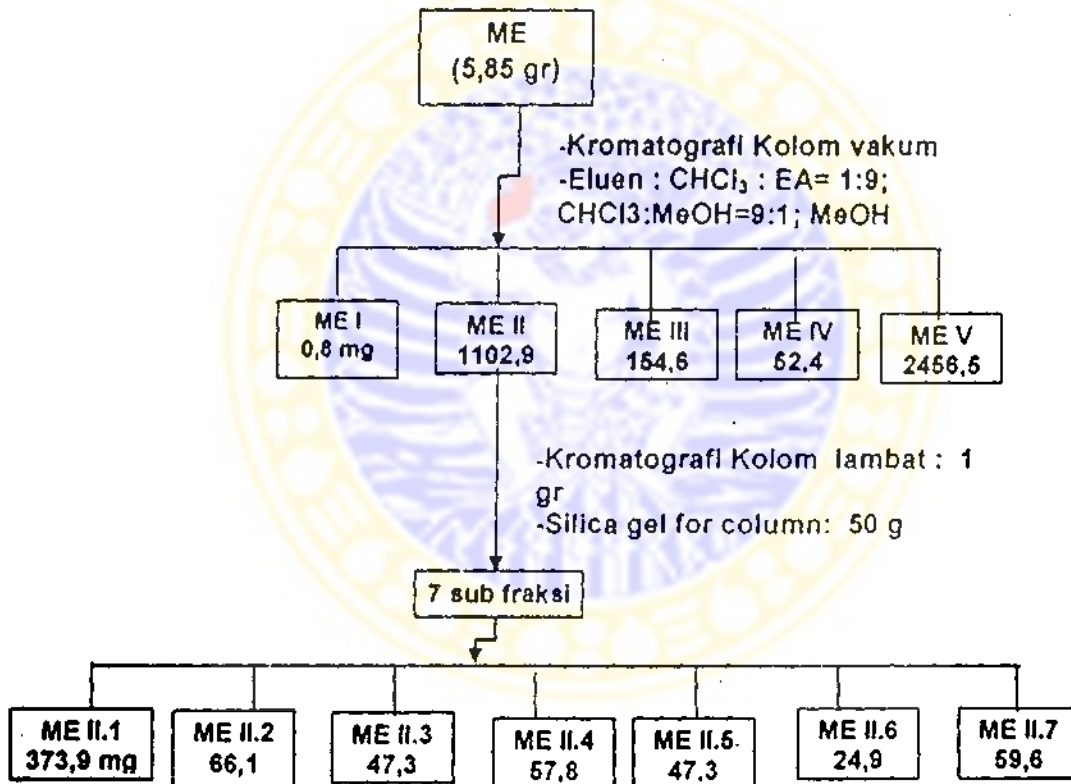


Gambar 5.3. Grafik rata-rata laju pertumbuhan *P.falciparum* pada pemberian fraksi ME II ekstrak metanol secara *in vitro*.

Berdasarkan data laju pertumbuhan dan persen hambatan terhadap parasit malaria, dilakukan perhitungan IC_{50} dari fraksi MEII dengan menggunakan analisa Probit, dan diketahui bahwa IC_{50} fraksi MEII sebesar $1,6497 \pm 0,8487$. Menurut Kohler (2002), suatu fraksi dikatakan aktif sebagai antimalaria apabila secara *in vitro* memiliki nilai $IC_{50} < 25 \mu\text{g/ml}$. Berdasarkan kriteria tersebut maka fraksi ME II ekstrak metanol aktif sebagai antimalaria. Pengujian antimalaria secara *in vivo* juga telah dilakukan terhadap ke lima fraksi hasil pemisahan dari ekstrak metanol tersebut dan dilaporkan bahwa fraksi MEII memiliki potensial antimalaria lebih tinggi dari fraksi lainnya dengan $ED_{50} = 0,014 \text{ mg/kgBB}$ mencit (Siska, 2007). Berdasarkan hal tersebut

fraksi MEII dapat diisolasi lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa aktif antimalaria yang terkandung di dalamnya.

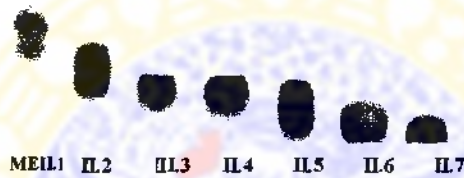
Selanjutnya terhadap fraksi ME II (1 gr) dilakukan pemisahan dengan kolom lambat menggunakan fase diam silika gel for column diameter 0,063-0,200 mm dan fase gerak CHCl_3 -MeOH 5% secara isokratik. Dari hasil pemisahan tersebut dihasilkan 7 sub fraksi utama. Skema pemisahannya terlihat pada Gambar 5.4.



Gambar 5. 4. Skema pemisahan fraksi ME II ekstrak metanol dengan menggunakan kromatografi kolom lambat.

Hasil identifikasi dengan KLT fase gerak CHCl_3 : MeOH 10% dan fase diam silika gel GF₂₅₄, dengan penampak noda serri sulfat 1% terlihat bahwa

sub fraksi MEII.3 dan II.4 menunjukkan spot berwarna kuning kemerahan yang diduga mengandung senyawa flavonoid (Gambar 5.5.)

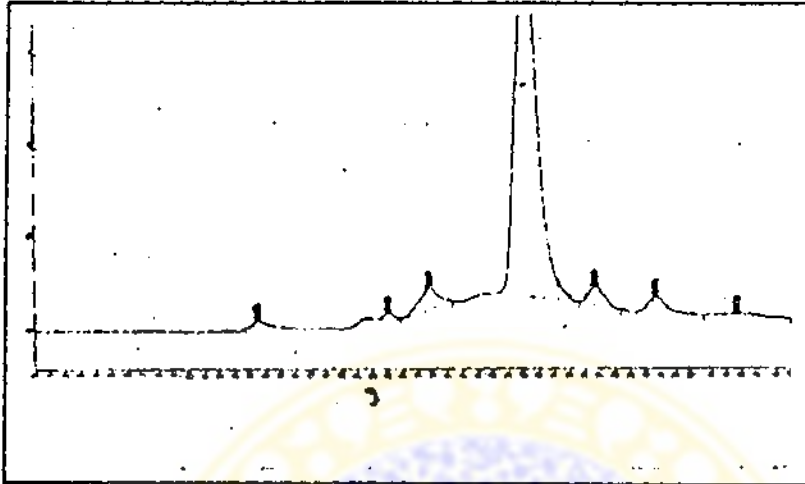


Gambar 5.5. Kromatogram hasil KLT 7 fraksi hasil pemisahan fraksi ME II, fase gerak CHCl_3 : MeOH 10 % fase diam silika gel GF₂₅₄ dan penampak noda serri-sulfat 1 %.

5.1.4. Pemisahan fraksi ME II.3 menggunakan KLT preparatif

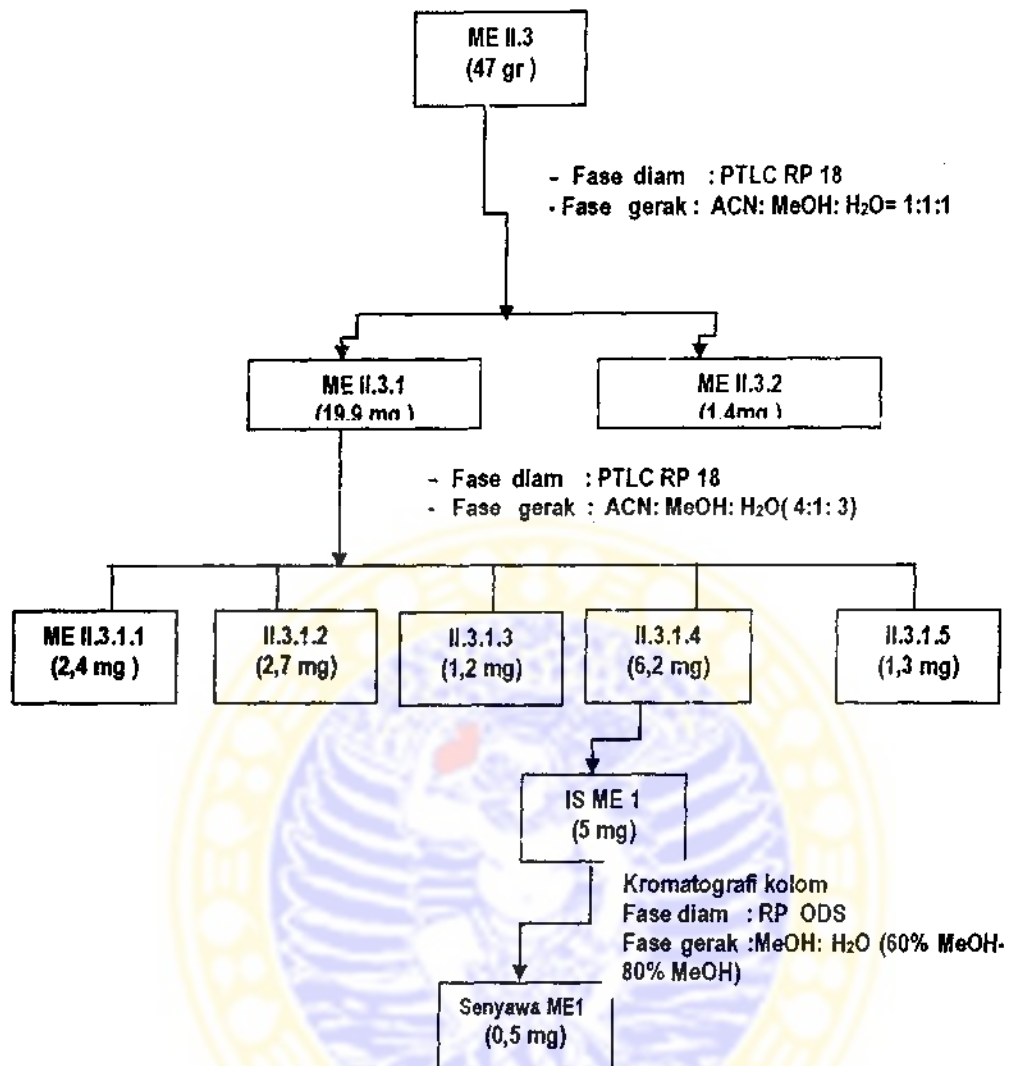
Selanjutnya dilakukan pemisahan terhadap fraksi MEII.3 dengan menggunakan KLT preparatif dengan fase gerak ACN : MeOH : H₂O (1 : 1 : 1) dan fase diam reverse phase RP 18. Pemisahan ini diperoleh 2 sub fraksi yaitu sub fraksi ME II.3.1 dan ME II.3.2. Sub fraksi ME II.3.1, berbentuk amorf kekuningan dan dengan penampak noda serri sulfat 1%, diduga mengandung senyawa flavonoid. Selanjutnya terhadap sub fraksi MEII.3.1 dilakukan identifikasi dengan kromatografi cair bertekanan tinggi (HPLC) menggunakan fase gerak ACN : MeOH : H₂O = 3 : 3 : 4 dan fase diam kolom

RP18 ODS. Profil sub fraksi menunjukkan masih terdapat 7 puncak dengan puncak utamanya pada Rt 32,38 menit (Gambar 5.6.)



Gambar 5.6. Profil HPLC sub fraksi ME II 3.1, fase gerak ACN: MeOH: H₂O (3:3:4), fase diam : kolom RP-18 (ODS).

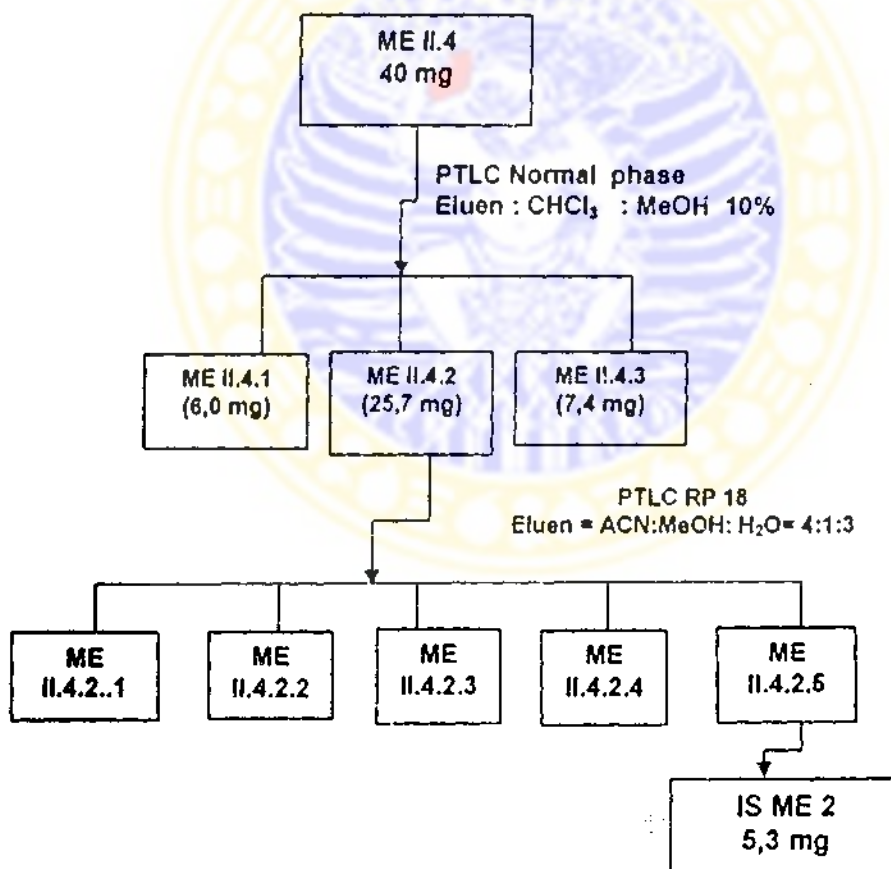
Selanjutnya terhadap sub fraksi ME II.3.1(9,9 mg) dilakukan pemisahan kembali dengan KLT preparatif menggunakan fase gerak ACN : MeOH:H₂O (4 :1 :3) dan fase diam lempeng KLT *reverse phase*-18 F_{254S}, dan diperoleh 5 isolat (MEII.3.1.1-3.1.5). Dalam proses pengeringannya Isolat ME II.3.1.3 merupakan serbuk amorf berwarna kuning kemerahan yang disebut **Isolat MEI** sebanyak 6,2 mg. Isolat hasil pemisahan sub fraksi ME II.3 ekstrak metanol ini kemudian diidentifikasi dengan KLT menggunakan fase gerak CHCl₃ : MeOH= 10% dan fase diam silika gel GF₂₅₄ terlihat di bawah ini (Gambar 5.7.).



Gambar 5.8. Skema pemisahan sub fraksi ME II.3 ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A.champeden* Spreng) dengan menggunakan lempeng KLT preparatif dan kromatografi kolom.

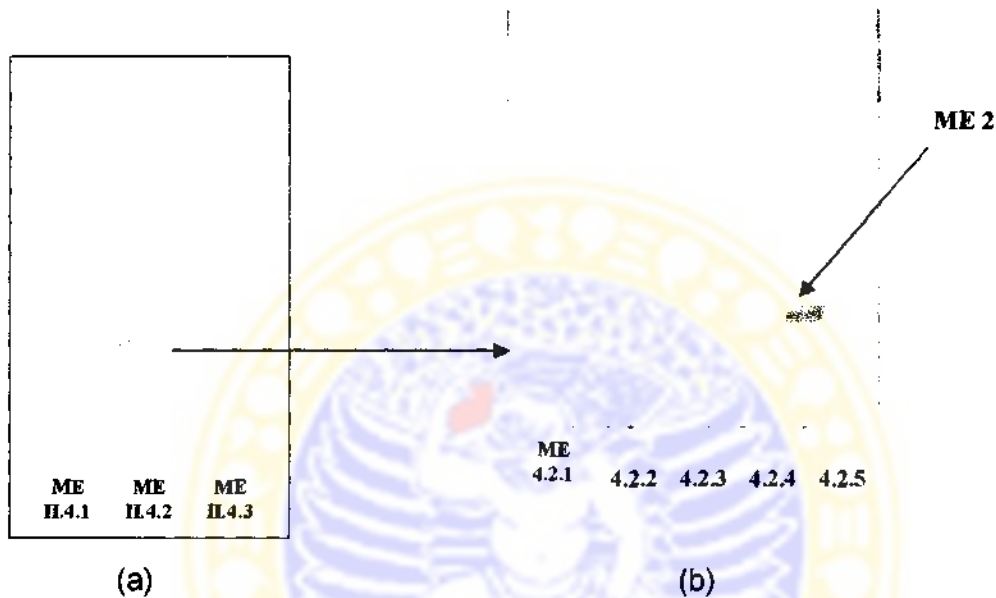
5.1.5. Pemisahan fraksi ME II.4 menggunakan KLT preparatif

Selanjutnya subfraksi ME II.4 sebanyak 40 mg dilakukan pemisahan menggunakan lempeng preparatif dengan fase diam silika gel normal phase (20x20 cm) dan fase gerak CHCl_3 : MeOH 10%. Hasil pemisahan diperoleh 3 sub fraksi utama (ME II.4.1-ME II.4.3). Selanjutnya fraksi ME II.4.2 yang dari hasil identifikasi dengan KLT dominan mengandung senyawa flavonoid (Gambar 5.10-a) dilakukan kembali pemisahan dengan lempeng KLT preparatif (fase gerak : ACN : MeOH: H_2O = 4:1:3 dan fase diam *reverse phase-18 F_{254S}*) (Gambar 5.9.).



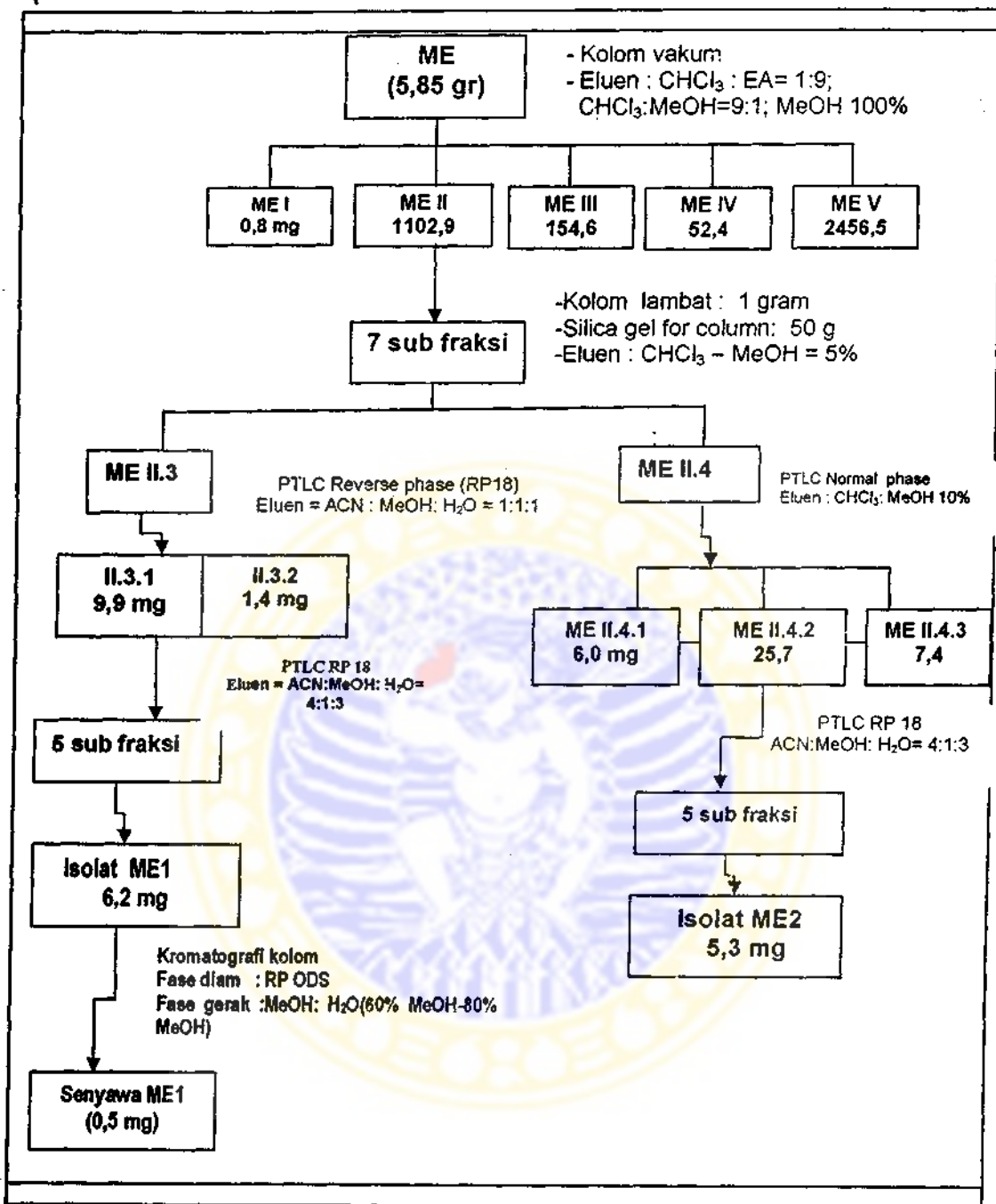
Gambar 5.9. Skema fraksinasi fraksi ME II.4, ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A.champeden* Spreng) dengan menggunakan KLT preparatif .

Hasil pemisahan sub fraksi ME II.4. diperoleh 5 sub fraksi utama. Sub fraksi ME II.4.2.5 (isolat ME 2) berbentuk amorf berwarna kuning kemerahan sebanyak 5,3 mg (Gambar 5.10-b).



Gambar 5.10. Kromatogram hasil KLT 3 fraksi hasil pemisahan MEII.4 dan KLT 5 sub fraksi utama pemisahan ME II.4.2 dengan fase gerak $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10\%$ fase diam silika gel GF 254 dan penampak noda cerri-sulfat 1 %.

Secara ringkas, langkah-langkah ekstraksi dan isolasi seperti yang telah dijelaskan di atas dapat ditunjukkan dengan skema sebagai berikut (Gambar 5.11.).



Gambar 5.11. Skema ekstraksi dan isolasi ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* Spreng.

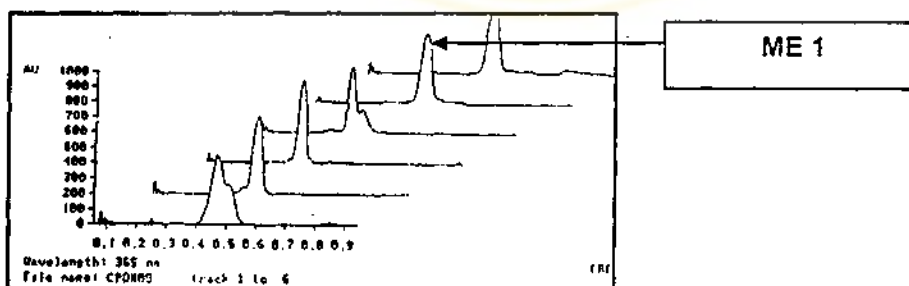
5.2. Hasil Identifikasi Senyawa ME1

5.2.1. Identifikasi dengan penampak noda dan pereaksi warna.

Identifikasi untuk mengetahui senyawa atau golongan senyawa yang terkandung dalam senyawa ME1 dilakukan dengan berbagai metode yaitu KLT dengan penampak noda, spektroskopi UV, spektroskopi Inframerah (IR) dan Identifikasi secara KLT ditujukan terutama untuk memeriksa kemungkinan terkandungnya flavonoid, terpenoid dan senyawa fenolik di dalam masing-masing isolat tersebut. Interpretasi hasil identifikasi terhadap senyawa ME1 dengan metode KLT menggunakan penampak noda terlihat pada Lampiran 1.

5.2.2. Identifikasi dengan densitometer

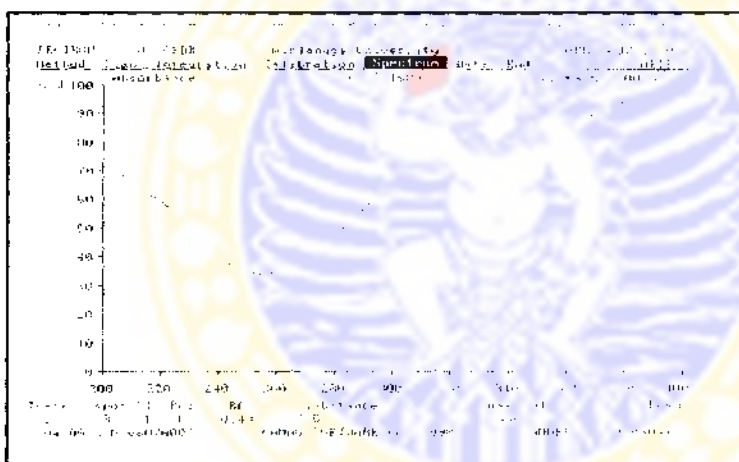
Identifikasi senyawa ME1 menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak CHCl₃:MeOH 10% dengan densitometer dilakukan pada UV 254 dan 365 nm. Pada profil kromatogram, senyawa ME1 menunjukkan puncak dominan pada R_f 0,36 Profil kromatogram densitometer senyawa ME1 dan gabungan fraksi lainnya ditampilkan dalam gambar di bawah ini (Gambar 5.12).



Gambar 5.12. Profil densitometer senyawa ME1, ekstrak metanol kulit batang cempedak (*A. champeden*) pada UV. 365 nm

5.2.3. Identifikasi profil dengan spektra UV

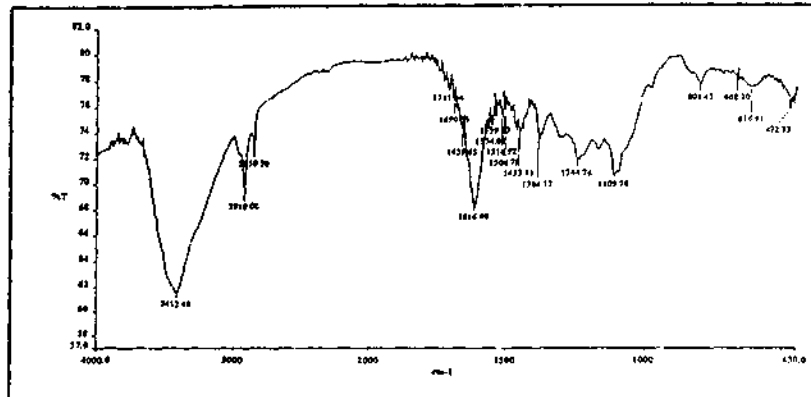
Identifikasi senyawa ME1 dengan spektra UV, dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak CHCl₃: MeOH 10% pada panjang gelombang 365 nm. Hasil identifikasi dengan menggunakan spektroskopi UV (terintegrasi dengan densitometer) menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai panjang gelombang maksimum sebesar 320 dan 380 nm. Spektra UV dari senyawa ME1 terlihat pada gambar 5.13. di bawah ini.



Gambar 5.13. Spektra UV dari senyawa ME1 pada panjang gelombang 365 nm menggunakan densitometer "Camag" TLC Scanner 3 (Cats version 4.06).

5.2.4. Identifikasi dengan spektrometri infra merah

Pada spektrum inframerah senyawa ME1, dapat diamati puncak serapan pada bilangan gelombang 3412 cm⁻¹, 2919 cm⁻¹, 1616 cm⁻¹ 1384 cm⁻¹ dan 1109 cm⁻¹. Spektrum infra merah senyawa ME1 terlihat pada Gambar 5.14. di bawah ini .



Gambar 5.14. Spektrum infra merah dari senyawa ME1 yang dibuat pellet dengan KBr dan dianalisis menggunakan spektrometer infra merah Perkin Elmer.

5.2.5. Hasil identifikasi dengan metode spektrofotometri RMI

Berdasarkan data spektra ^1H -RMI, ^{12}C -RMI, COSY-RMI, HMBC-RMI HSQC-RMI, dari senyawa ME1 (Lampiran1), kemudian dilakukan konfirmasi struktur senyawa tersebut dengan spektra senyawa morakhalkon A (2,4,2',4'-tetrahidro-3'(3-metil-2 butenil)-khalkon (Monache,1995). Data geseran kimia spektra ^1H dan ^{13}C RMI dari senyawa ME1 dan morakhalkon A terlihat pada tabel 5.2 di bawah ini.

Tabel 5.2. Data geseran kimia Spektra ^1H dan ^{13}C RMI dari senyawa morakalkon A dan senyawa ME1 di dalam aseton d-6

Karbon	^{13}C Morakalkon A	^{13}C senyawa ME1	^1H morakalkon A	^1H senyawa ME1
α	145,3	140,9	7,78 (1H,d,J=15,5 Hz)	7.80 (1H,d)
β	117,6	117,5	8,19 (1H,d,J=15,5 Hz)	8.21 (1H,d)
CO	193,2	193,4	-	-
1'	114,1	115	-	-
2'	162,7	160	-	-
3'	115,9	115	-	-
4'	164,5	160	-	-
5'	107,8	107,9	6,51 (1H,d,J=9 Hz)	6,53 (1H,d)
M6'	131,7	129,9	7,86 (1H,d,J=9 Hz)	7,88 (1H,d)
1	115,6	115	-	-
2	159,7	160	-	-
3	103,6	103,7	6,50 (1H,d,J=2,5 Hz)	6,54 (1H,d)
4	162,5	160	-	-
5	109,1	109,1	6,43 (1H,dd,J=8,5+2,5 Hz),	6,46 6,47 (1 H,dd)
6	132,8	131,8	7,66 (1H,d,J=8,5 Hz)	7,67 (1H, d)
CH ₂	22,3	22,3	3,35 (2H,d,J=7 Hz)	3,38 (2 H,dd)
CH=	123,4	123,5	5,25 (1H,br t,J=7 Hz)	5,30 (1H,t)
C=	131,8	130,4	-	-
E-Me	25,8	25,9	1,62 (3H, s)	1.66 (1H,s)
Z-Me	17,9	17,9	1,76 (3H, s)	1.79 (1H,s)

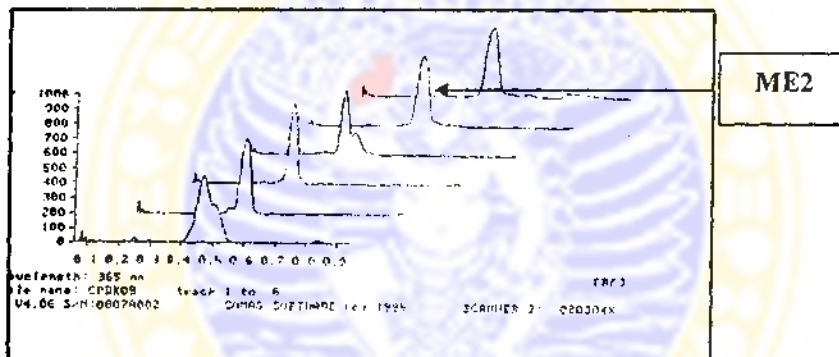
5.3. Identifikasi isolat ME2

5.3.1. Identifikasi dengan penampak noda dan pereaksi warna

Identifikasi terhadap isolat ME2 dengan penampak noda dan pereaksi warna menghasilkan profil yang sama dengan morakhaikon A (Lampiran 1).

5.3.2. Identifikasi isolat ME2 dengan densitometer

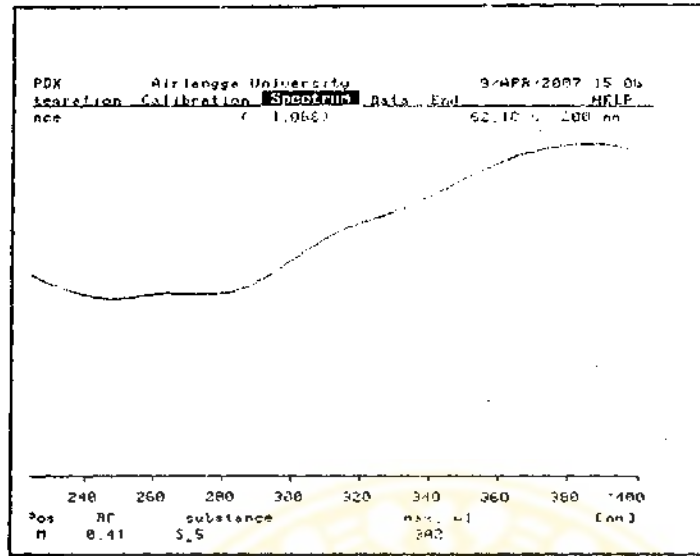
Identifikasi Isolat ME2 dengan densitometer, UV 365 nm terdapat puncak dominan pada Rf 0,36. Profil kromatogram densitometer isolat ME2 dan gabungan fraksi lainnya ditampilkan pada gambar di bawah ini (Gambar 5.15.)



Gambar 5.15. Profil densitometer isolat ME 2, pada UV. 365 nm

5.3.3. Identifikasi profil dengan spektra UV

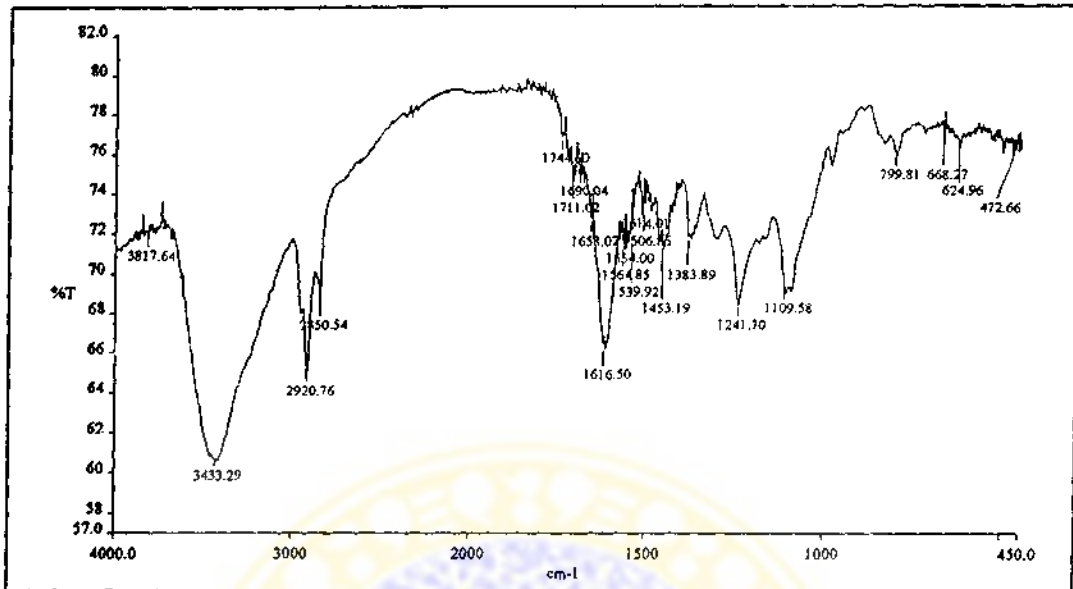
Hasil identifikasi isolat ME 2 dengan spektra ultra violet, menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak CHCl₃: MeOH 10% pada panjang gelombang 365 nm menunjukkan bahwa isolat ME2 mempunyai panjang gelombang maksimum sebesar 382 nm.



Gambar 5.16. Spektra UV dari isolat ME2 pada panjang gelombang 365 nm menggunakan densitometer "Camag" TLC Scanner 3 (Cats version 4.06)

5.3.4. Identifikasi dengan Spektrometri Infra Merah

Pada spektrum inframerah isolat ME2, dapat diamati puncak serapan pada bilangan gelombang 3433 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 1616 cm^{-1} , 1241 cm^{-1} dan 1109 cm^{-1} . Spektrum inframerah isolat ME2 terlihat pada gambar 5.17. di bawah ini.



Gambar 5.17.Spektrum infra merah dari isolat ME2 yang dibuat pellet dengan KBr dan dianalisis menggunakan spektrometer infra merah Perkin Elmer.

5.4. Uji aktivitas antimalaria Isolat dan senyawa aktif antimalaria *A. champeden*.

Uji aktivitas antimalaria dilakukan pada senyawa morakhalkon A dan ME2 dari ekstrak metanol serta 3 (tiga) senyawa dari ekstrak diklorometana yaitu sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan artoindonesianin R (Zaini, 2006; Widyawaruyanti 2007, lihat lampiran 2). Berdasarkan data persen parasitemia dari setiap konsentrasi senyawa yang digunakan, maka dapat digambarkan grafik laju pertumbuhan rata-rata parasit seperti terlihat pada gambar 5.18. di bawah ini.

Senyawa Morakhalkon A

Laju pertumbuhan parasit, *P. falciparum* pada setiap dosis yang digunakan (0, 0.001, 0.01, 01, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) diperlihatkan pada Gambar 5.18a. Laju pertumbuhan tampak menurun pada dosis yang lebih besar dan kurva laju pertumbuhan berbentuk sigmoidal (*dose-dependent*). Pada pemberian dosis 10 mg/ml senyawa Morakhalkon A, pertumbuhan parasit dihambat seluruhnya.

isolat ME2

Laju pertumbuhan parasit, *P. falciparum* pada setiap dosis yang digunakan (0, 0.001, 0.01, 01, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) diperlihatkan pada Gambar 5.18b. Pada dosis terendah 0.001 mg/ml, laju pertumbuhan parasit terhambat sampai 20%, sedangkan pada dosis 0.01 dan 0.1 $\mu\text{g/ml}$, pertumbuhan parasit relatif sama. Pada dosis tertinggi (10 mg/ml) yang digunakan, masih ditemukan pertumbuhan parasit sekitar 20%.

Senyawa sikloheterofilin

Laju pertumbuhan parasit, *P. falciparum* pada setiap dosis yang digunakan (0, 0.001, 0.01, 01, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) diperlihatkan pada Gambar 5.18c. Pada dosis terendah (0.01 $\mu\text{g/ml}$) laju pertumbuhan parasit hanya mencapai sekitar 60% dibanding kelompok tanpa pemberian senyawa (Gambar 5.1.8c). Laju pertumbuhan tampak menurun pada dosis yang lebih besar dan kurva laju pertumbuhan berbentuk sigmoidal (*dose-dependent*). Pada

dosis tertinggi (10 mg/ml), pertumbuhan parasit telah dapat dihambat seluruhnya.

Senyawa Artoindonesianin R

Laju pertumbuhan parasit, *P. falciparum* pada setiap dosis yang digunakan (0, 0.001, 0.01, 01, 1, 10 µg/ml) diperlihatkan pada Gambar 5.18d. Pada dosis terkecil yang digunakan, laju pertumbuhan parasit mencapai 80% dari kelompok kontrol tanpa senyawa. Pada dosis tertinggi yang digunakan, laju pertumbuhan parasit sekitar 20% masih ditemukan.

Senyawa Artoindonesianin A-2

Laju pertumbuhan parasit, *P. falciparum* pada setiap dosis yang digunakan (0, 0.001, 0.01, 01, 1, 10 µg/ml) diperlihatkan pada Gambar 5.18e. Pada dosis terendah yang digunakan, laju pertumbuhan parasit mencapai 93% dibanding kelompok kontrol tanpa pemberian senyawa. Pada dosis 0.1 dan 1 mg/ml laju pertumbuhan parasit relatif sama. Pada dosis tertinggi yang digunakan, laju pertumbuhan parasit sekitar 20% masih ditemukan.

Selanjutnya hambatan pertumbuhan parasit 50% (IC_{50}) dari semua senyawa dan isolat yang diuji ditentukan dengan menggunakan analisis probit berdasarkan data konsentrasi versus persen penghambatan (Lampiran 3). Dari kelima senyawa yang diuji, nilai IC_{50} terendah diperoleh pada senyawa sikloheterofilin (Tabel 5.3). Senyawa morakhalkon A dan isolat ME2 memiliki IC_{50} masing masing sebesar $0,283 \pm 0,113$ µg /ml dan $0,353 \pm 0,007$ µg/ml.

Tabel 5.3. Nilai IC₅₀ dari senyawa hasil isolasi ekstrak metanol dan diklorometana kult batang *A. champeden* pada uji antimalaria *in vitro*.

Isolat /senyawa	Rata-rata % hambatan					IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
	K1	K2	K3	K4	K5		
Sikloheterofilin	99,82	85,82	72,91	44,55	40,00	0,08	0,02
Artoindonesianin A-2	82,71	43,49	41,10	17,29	7,02	0,49	1,31
Artoindonesianin R	78,01	50,96	35,78	18,32	8,90	0,53	1,32
Morakhalkon A	100,00	62,40	37,79	6,30	1,62	0,28	0,83
Isolat ME 2	77,26	59,35	35,40	32,74	0,00	0,353	-

Keterangan Tabel:

K1 = konsentrasi 10 µg/ml ; K2 = konsentrasi 1 µg/ml ; K3 = konsentrasi 0,1 µg/ml, K4 = konsentrasi 0,01 µg/ml, K5 = konsentrasi 0,001 µg/ml.

5.5. Efek senyawa aktif terhadap morfologi parasit malaria.

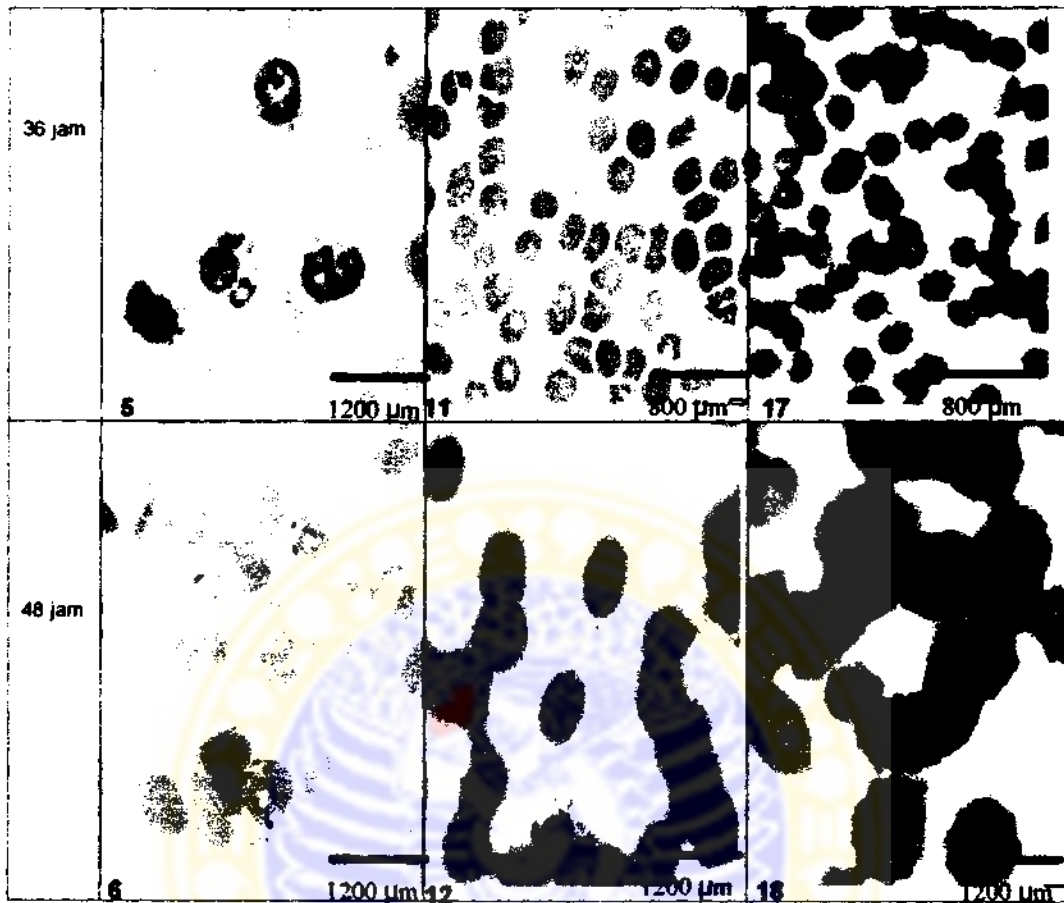
Efek patologis dari semua senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antimalaria dianalisis secara khusus pada morfologi parasit setelah inkubasi *in vitro* selama 6, 12, 24, 36 dan 48 jam, dengan menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop elektron transmisi.

5.5.1. Pengamatan morfologi parasit malaria dengan mikroskop cahaya.

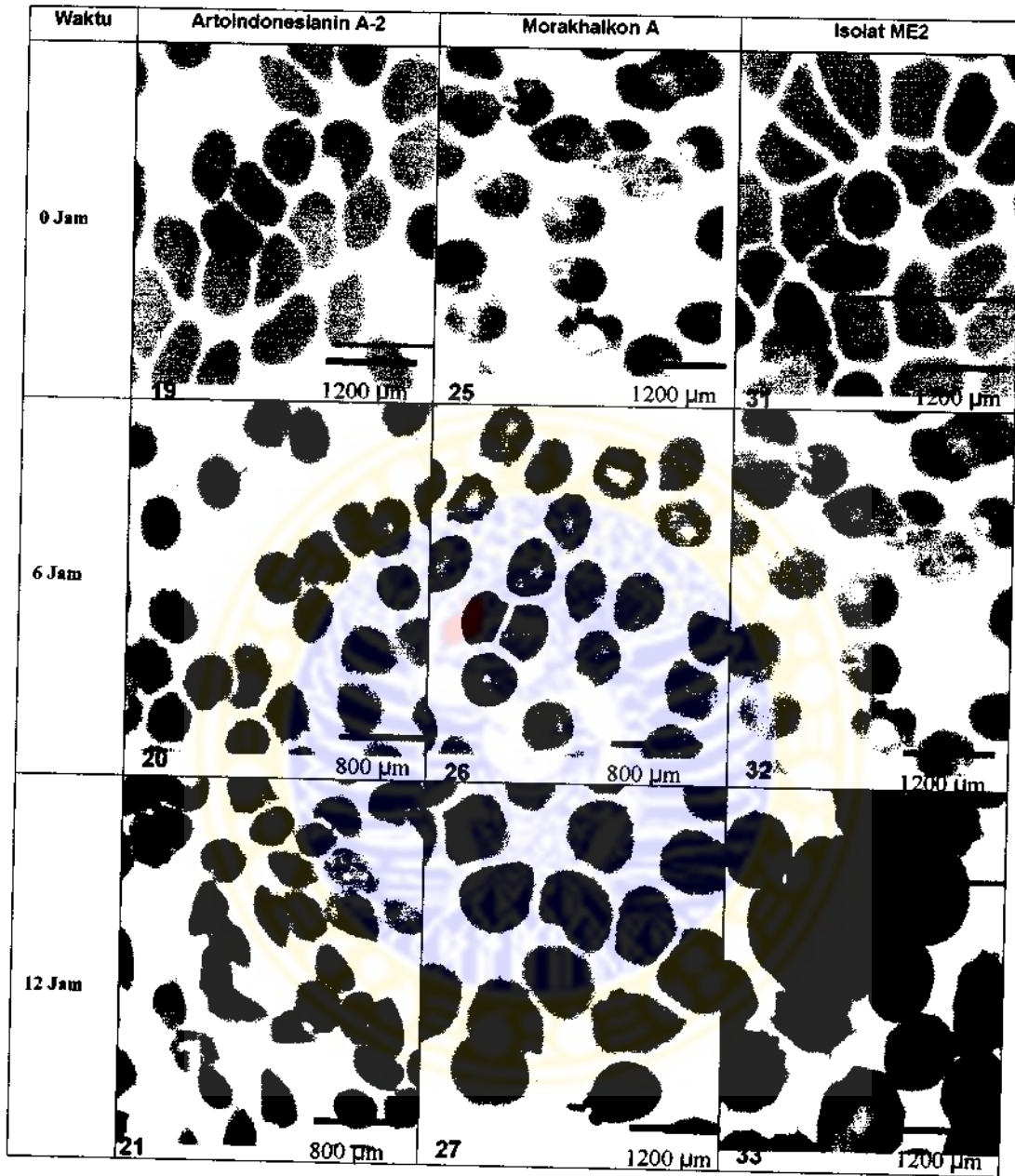
Pada pemeriksaan dengan mikroskop cahaya, parasit yang tidak diberi senyawa flavonoid tampak mengalami perubahan morfologi yang nyata, mulai dari bentuk cincin pada saat pembiakan parasit, kemudian bentuk cincin yang menebal pada jam ke 6 serta mulai ditemukannya pigmen yang berwarna kuning tengguli setelah 12 jam. Setelah 24 jam, stadium trofozoit

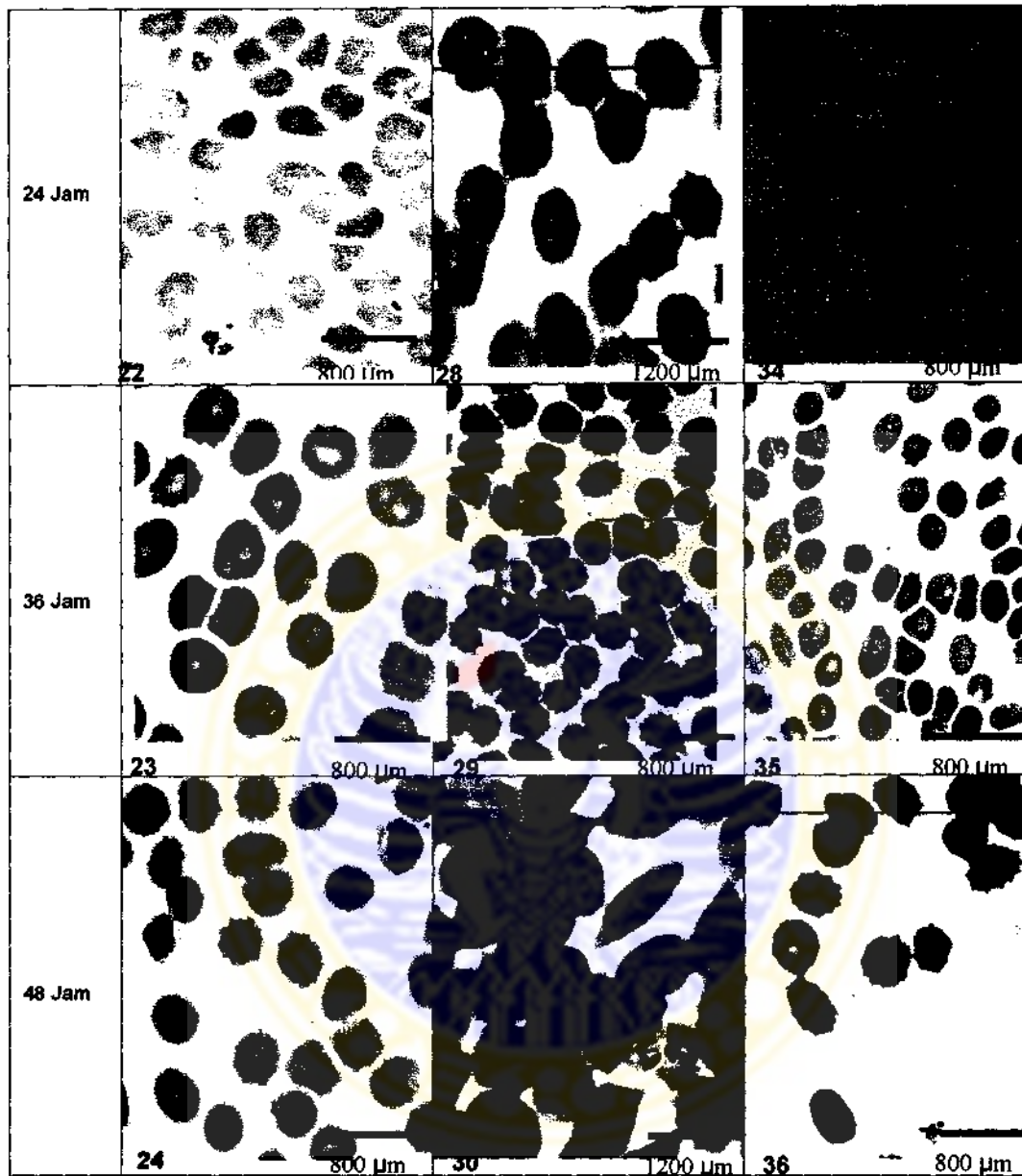
mulai membesar dengan pigmen yang makin menonjol (5.19-4). Setelah inkubasi 36 jam, pada kelompok kontrol tanpa obat, telah banyak ditemukan bentuk skizon (Gambar 5.19-5) dan pada inkubasi 48 jam, stadium cincin dan trofozit muda mulai tampak lagi (Gambar 5.19-6).

Pada kelompok parasit yang diberi senyawa flavonoid, sampai dengan inkubasi 12 jam, tidak ditemukan adanya perubahan morfologi yang berbeda dengan kelompok kontrol, yang tidak diberikan senyawa flavonoid. Setelah inkubasi dengan senyawa flavonoid selama 24 jam, kelainan morfologi berupa trofozoit yang terletak di luar eritrosit (Gambar 5.19-10), bentuk trofozoit dengan inti kecil tanpa pigmen (Gambar 5.19-17), pigmen yang berbentuk bulat berwarna hitam (Gambar 5.19-18) dapat ditemukan pada semua senyawa flavonoid yang diuji. Setelah inkubasi 36 jam, pada kelompok yang diobati dengan ke 5 senyawa flavonoid, bentuk utama yang banyak ditemukan adalah trofozoit yang kecil tanpa pigmen atau dengan pigmen berwarna gelap (Gambar 5.19-17), sedangkan stadium skizon sangat jarang ditemukan.



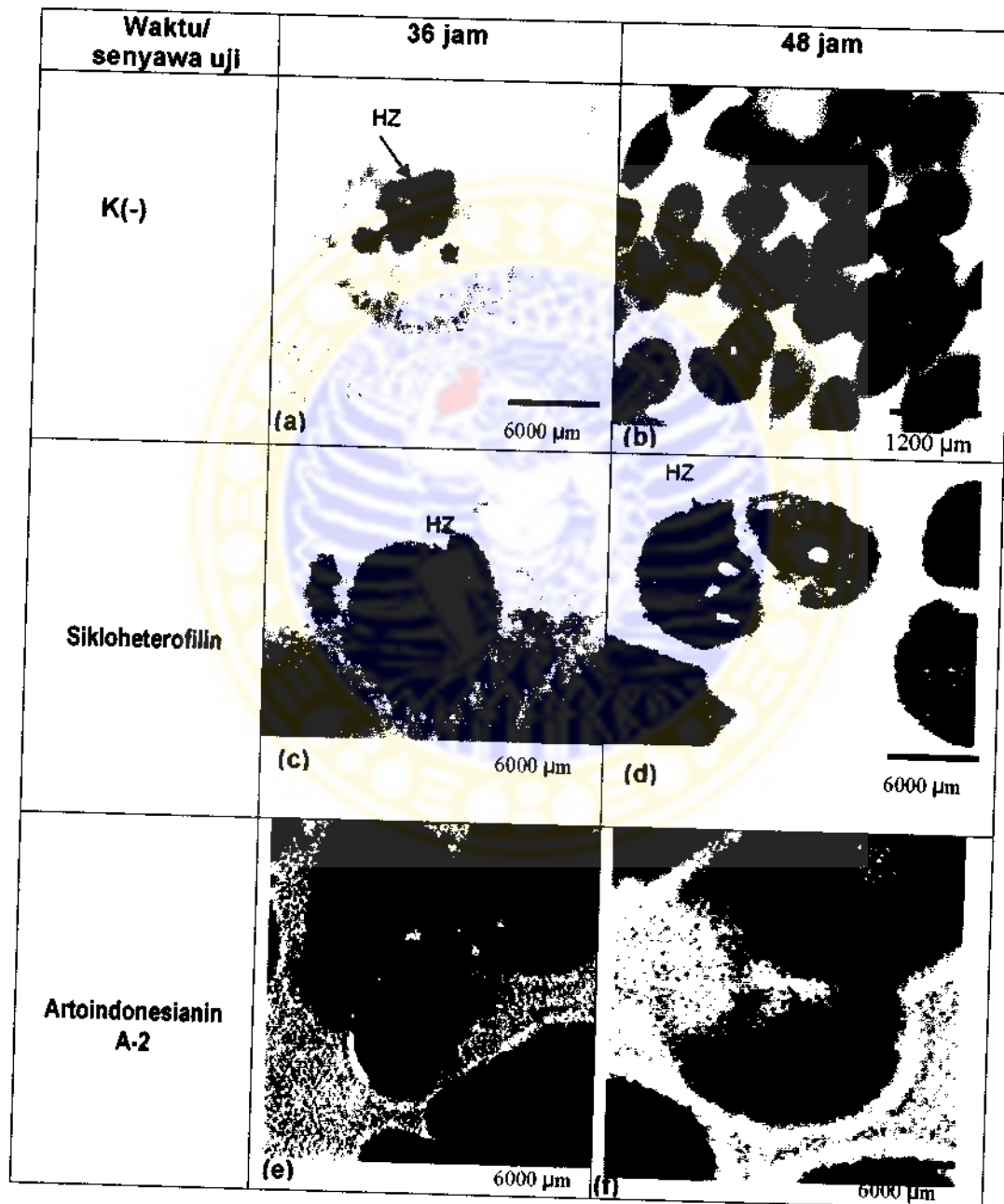
Gambar 5.19. Morfologi *P.falciparum* 3D7 pada biakan parasit yang diinkubasi dengan senyawa *A.champeden* selama 0- 48 jam. Kontrol negatif (1-6), senyawa sikloheterofilin (7-12), artoindonesianin R (13-18), menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 10x100. Skala 600 μm .

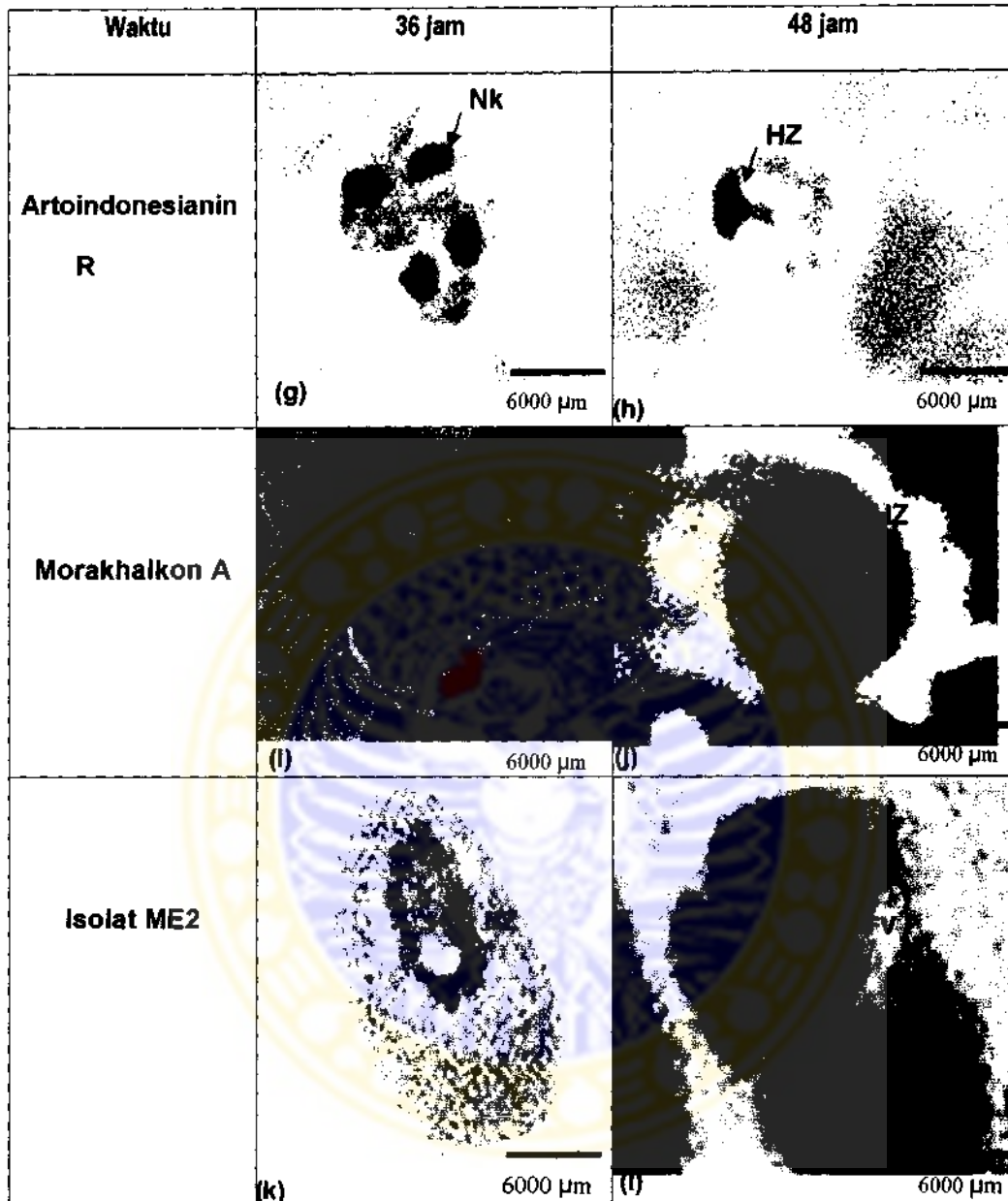




Gambar 5.20. Morfologi *P.falciparum* 3D7 pada kultur parasit yang diinkubasi dengan senyawa *A.champeden* selama 0- 48 jam. Artoindonesianin A-2, (19-24), morakhalkon A (25-30) dan ME2 (31-36), menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 10x100.

Selanjutnya perubahan morfologi parasit malaria yang terlihat pada stadium trofozoit selama diinkubasi 36 dan 48 jam karena pemberian senyawa aktif antimalaria *A.champeden*, terlihat pada Gambar 5.21 di bawah ini.





Gambar 5.21. Perubahan morfologi stadium trofozoit *P. falciparum* (strain 3D7) yang diinkubasi dengan senyawa aktif antimalaria *A.champeden* pada jam 36-48.

Keterangan Gambar :

(a-b) kontrol negatif, (c-d) sikloheterofilin, (e-f) artoindonesianin A-2, (g-h) artoindonesianin R, (i-j) morakhalkon A dan (k-l) ME2, menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 10x100. FV = vakuola makanan parasit dan HZ = Hemozoin, Nk= inti kecil. Skala 6000 μm.

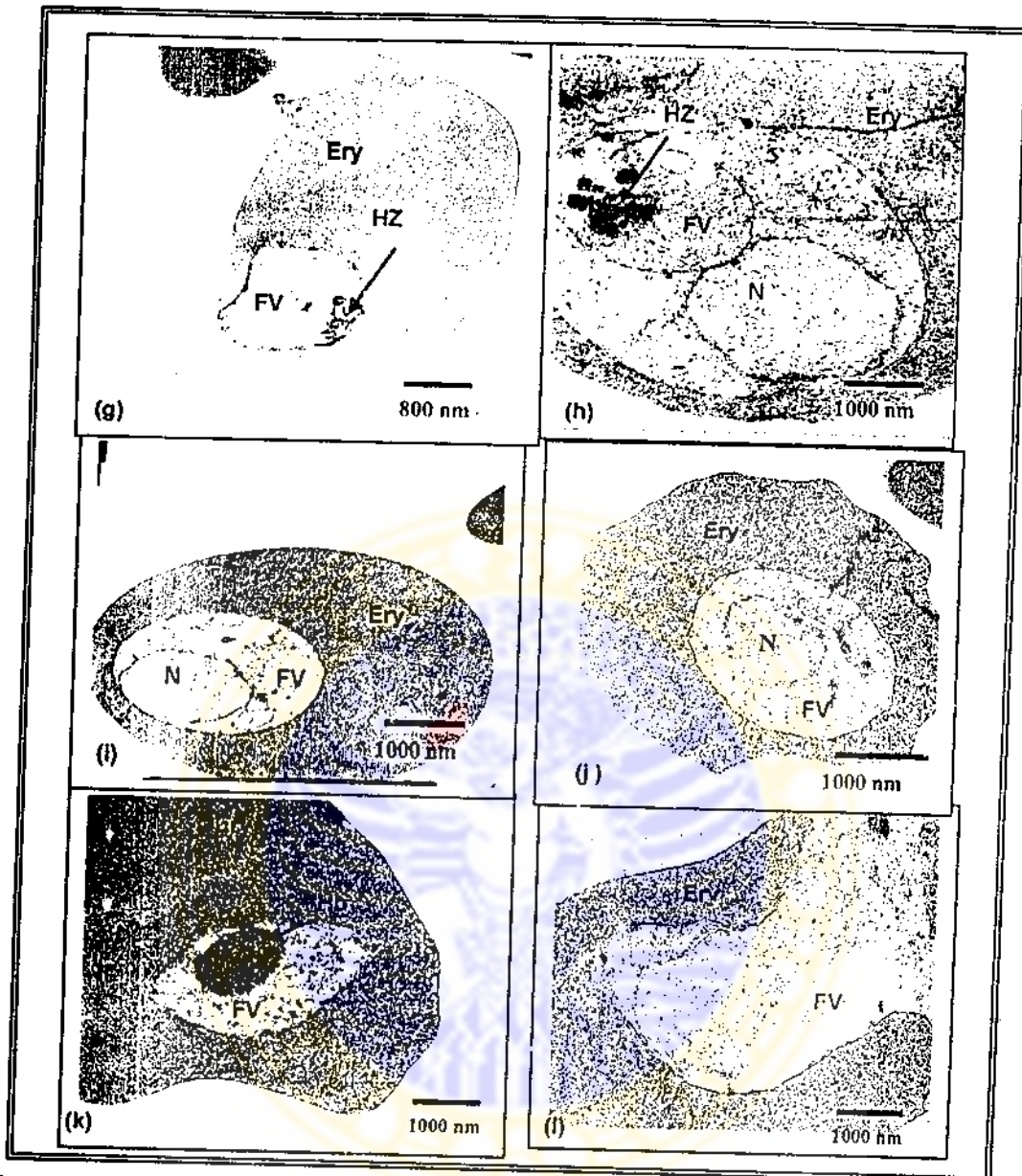
5.5.2. Analisis ultrastruktur parasit malaria dengan mikroskop elektron transmisi

Pengamatan morfologi parasit malaria dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi menunjukkan adanya perubahan morfologi parasit pada pengamatan 6 dan 24 jam. Bentuk parasit yang bulat dengan inti yang jelas dan diliputi oleh membran ganda banyak ditemukan pada pengamatan 6 jam pertama (Gambar 5.22.a). Parasit dan eritrosit dibatasi, yang umumnya berhimpit dengan membran luar parasit, sehingga tidak kelihatan dengan jelas. Pada membran luar parasit, kadang dapat ditemukan suatu lekukan, yang disebut sebagai sitostoma, yang memiliki fungsi sebagai mulut untuk mengisap hemoglobin, melalui proses endocytosis, yang melibatkan lisosome sekunder. Setelah proses endocytosis selesai, hemoglobin yang telah diperoleh akan diangkut oleh lisosom sekunder ke vakuola makanan melalui proses fusi (penggabungan). Pada tahap selanjutnya, parasit akan mencerna hemoglobin dan menghasilkan suatu hasil antara berupa *heme*, yang oleh parasit akan dipolimerisasi menjadi bentuk hemozoin. Sitoplama parasit dipenuhi oleh struktur-struktur seperti vakuola makanan dengan hemozoin yang berbentuk anyaman seperti tikar, organel yang memiliki membran ganda (*bilaminar wall*). Pada pengamatan di jam ke 24, parasit yang ditemukan umumnya dalam bentuk trofozoit tua, dengan struktur yang telah berkembang misalnya inti yang berlobus, sitoplasma yang diliputi oleh berbagai organel, seperti vesikel transpor

(*lisosom mediated*) yang mengangkut protein dari luar dan ke dalam sel eritrosit, vakuola makanan yang berisi hemozoin, serta sitostoma (Gambar 5.22. b).

Mikrograf morfologi *P.falciparum* yang diinkubasi dengan senyawa aktif antimalaria pada 6 dan 24 jam, terlihat pada Gambar 5.22. di bawah ini.





Gambar 5.22. Gambaran ultrastruktur stadium trofozoit *P.falciparum* yang berada di dalam sel eritrosit.

(a-b) Trofozoit normal *P. falciparum* (kontrol negatif). *P. falciparum* yang diinkubasi 6 dan 24 jam dengan senyawa : sikloheterofilin (c-d), artoindonesianin A-2 (e-f), artoindonesianin R (g-h), morakhalkon A (i-j) dan isolat ME2, k-l). Pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi pembesaran 15.000x. Skala dalam bar : 800-1000 nm. Hb=hemoglobin; FV= vakuola makanan; N =nukleus; HZ =hemozoin; TV= transfer vesikel; Ery =eritrosit; Kn =Knop; Cys = sitostoma.

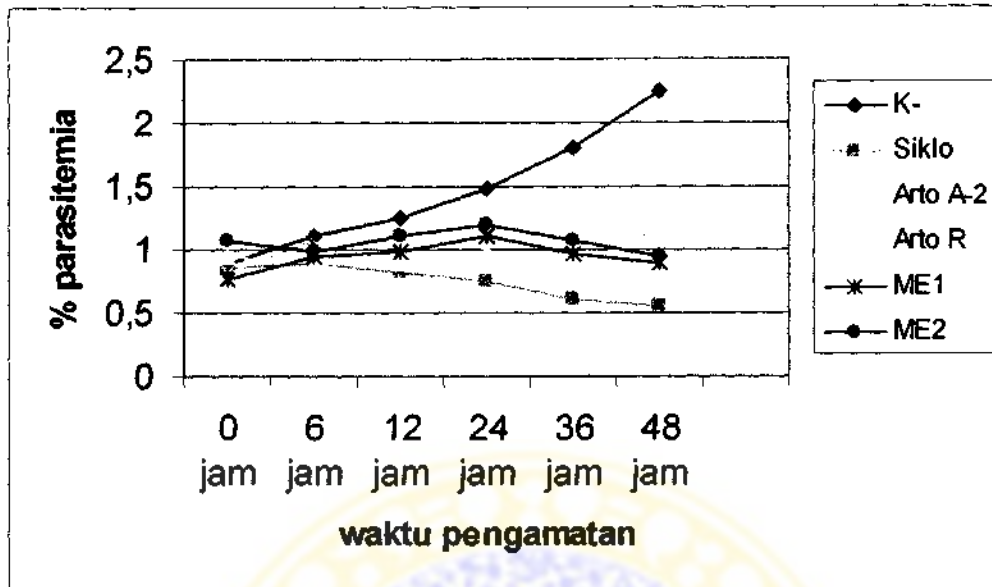
Pada stadium trofozoit normal terlihat adanya hemozoin di vakuola makanan parasit malaria dan inti sel di dalam sitoplasma (Gambar 5.22-a dan b). Adanya hemozoin pada vakuola makanan mengindikasikan bahwa telah terjadi pengambilan hemoglobin sebagai sumber nutrisi dari sitosol eritrosit ke dalam vakuola makanan dan secara hidrolisis diubah menjadi heme dan globin. Selanjutnya heme yang bersifat toksik bagi parasit telah didetoksifikasi menjadi hemozoin sebagai produk yang tidak toksik bagi parasit.

Di sisi lain pada kultur *P.falciparum* yang diinkubasi dengan senyawa sikloheterofilin selama diinkubasi 6 dan 24 jam (Gambar 5.22.c-d), artoindonesianin A-2 (Gambar 5.22.e-f) dan artoindonesianin R selama selama inkubasi 24 jam (Gambar 5.22.g-h) juga terlihat adanya vakuola makanan yang berisi hemozoin, sama dengan yang teramati pada kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa proses detoksifikasi heme berlangsung normal.

Hal yang berbeda teramati pada ultrastruktur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan senyawa morakhalkon A pada pengamatan 6 dan 24 jam (Gambar 5.22-i-j). Pada vakuola makanan parasit malaria yang diberikan isolat tersebut, terlihat kosong, tidak adanya hemozoin. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa morakhalkon A memiliki potensi menghambat pembentukan hemozoin. Selanjutnya parasit malaria yang diinkubasi dengan isolat ME2, pada pengamatan 6 jam terlihat bahwa pada vakuola makanan terdapat hemoglobin yang tidak didegradasi, dan pada pengamatan 24 jam vakuola makanan tidak terdapat hemozoin (Gambar

5.22.k-l). Gambaran ultrastruktur yang berbeda ini diduga disebabkan 2 hal : (1) pada 6 jam inkubasi efek senyawa aktif menyebabkan hemoglobin tidak dapat didegradasi sehingga tidak terbentuk heme dan globin, dan sampai 24 jam vakuola makanan terlihat kosong (2) gambaran ini merupakan awal masuknya hemoglobin ke dalam vakuola makanan parasit (6 jam inkubasi). Selanjutnya proses degradasi hemoglobin telah berlangsung dimana hemoglobin diubah menjadi heme dan globin, dan efek senyawa aktif ME2 berpengaruh menghambat detoksifikasi heme parasit malaria, sehingga pada vakuola makanan terlihat kosong, tidak terbentuk hemozoin setelah 24 jam.

Berdasarkan analisis morfologi dimana *P.falciparum* 3D7 yang diinkubasi dengan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari *A.champeden* mengalami beberapa perubahan morfologi, dan juga mempengaruhi persentase parasitemianya selama masa inkubasi 0-48 jam dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Grafik tingkat parasitemia *P.falciparum* 3D7 yang diinkubasi dengan senyawa flavonoid aktif antimalaria dari *A.champeden* pada 0,6, 12, 24, 36 dan 48 jam, terlihat pada Gambar 5.23. di bawah ini .



Gambar 5.23. Grafik tingkat parasitemia *P.falciparum* 3D7 yang diinkubasi senyawa aktif *A.champeden* pada waktu pengamatan 0, 6,12, 24, 36 dan 48 *in vitro*.

Berdasarkan grafik di atas terlihat bahwa tingkat parasitemia pada kultur parasit yang tidak diberikan senyawa aktif (kontrol negatif) terus meningkat pada sampai pada 48 jam. Sedangkan kultur parasit yang diberikan senyawa aktif antimalaria persen parasitemianya menurun mulai pada jam ke-24 sampai pada pengamatan ke 48 jam. Dari grafik tersebut dapat dijelaskan juga bahwa biakan parasit yang diinkubasi dengan senyawa sikloheterofilin, menyebabkan parasit tumbuh dengan tingkat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan biakan parasit yang diinkubasi dengan isolat dan senyawa aktif lainnya. Selanjutnya persen parasitemia berdasarkan stadium parasit malaria disajikan pada gambar 5.24. di bawah ini.

masa inkubasi 48 jam, proporsi stadium cincin sangat rendah dibandingkan kontrol negatif yang seharusnya, persen parasitemia pada stadium cincin lebih besar dari proporsi trofozoit seperti pada kontrol negatif.

5.6. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap aktivitas biokimiawi parasit malaria

5.6.1. Uji efek senyawa aktif antimalaria terhadap degradasi hemoglobin.

Pengujian efek senyawa aktif antimalaria dari *A. champeden* terhadap aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan parasit khususnya degradasi hemoglobin, dilakukan dengan menginkubasi isolat dan senyawa aktif (konsentrasi akhir 10 µg/ml) pada eritrosit yang terinfeksi *P. berghei* selama 0-6 jam. Preparasi *cell-free* parasit yang diinkubasi dengan senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R, morakhalkon A dan ME2, dideteksi dengan elektroforesis menggunakan SDS polyacrilamide gel (SDS-PAGE). Sebelum elektroforesis dilakukan pengukuran masing-masing protein sampel menggunakan metode Bradford, sehingga dapat ditentukan kadar protein yang seragam saat elektroforesis. Dari hasil perhitungan kadar protein sampel dan volume yang dibutuhkan untuk elektroforesis maka kadar protein yang didapatkan untuk masing-masing sampel sebesar 5,025 µg (Lampiran 7). Pengamatan hasil elektroforesis didasarkan ada tidaknya pita globin pada 16 kDa sesuai dengan low marker protein yang digunakan dibandingkan dengan kontrol negatif. Efek senyawa aktif terhadap proses

hidrolisis hemoglobin pada parasit malaria, diharapkan telah terjadi selama masa inkubasi 0-6 jam.

Hasil elektroforesis dengan menggunakan pewarnaan perak nitrat disajikan pada gambar 5.25. di bawah ini.



Gambar 5.25. Hasil Elektroforesis *P.falciparum* pada pemberian senyawa aktif dibandingkan dengan marker.

Keterangan Gambar :

Hemoglobin standart (line 1), Morakalkhon, 0-jam (line 2), Morakalkhon A 6-jam (line 3), ME2, 0-jam (line 4), ME2 6-jam (line 5), kontrol negatif 0-jam (line 6), Low marker protein (Biorad) (line 7), Sikloheterofilin 0-jam (line 8), Sikloheterofilin 6-jam (line 9), Artoindonesianin R, 0-jam (line 10), Artoindonesianin R 6-jam (line 11), Artoindonesianin A-2 0-jam (line 12), Artoindonesianin A-2 6-jam (line 13), kontrol negatif 6-jam (line 14).

Berdasarkan Gambar 5.25. terlihat bahwa hasil SDS-PAGE parasit malaria yang diinkubasi selama 6 jam dengan senyawa morakalkhon A (line

3), ME2 (line 5), sikloheterofilin (line 9), artoindonesianin R (line 11) dan artoindonesianin A-2 (line 13) nampak adanya band globin yang tebal pada 16 kDa. Hal ini sesuai dengan yang ditunjukkan juga oleh marker protein (line 7) dan hemoglobin standart (line1) dan berbeda dengan kontrol negatif dimana hanya terlihat band globin yang tipis (line 14). Selanjutnya hasil SDS-PAGE, pada pengamatan 0 jam, terlihat adanya band globin yang sangat tipis baik pada kultur parasit yang diberikan senyawa sikloheterofilin (line 8), artoindonesianin R (line10), artoindonesianin A-2 (line12) dan sama dengan kontrol negatif tanpa pemberian senyawa aktif 0 jam (line 6). Pada biakan parasit yang diberikan senyawa morakhalkon A (line 2) dan isolat ME2 (line 4) pengamatan 0 jam, dari hasil elektroforesis terlihat juga adanya band globin yang tipis.

5.6.2. Uji efek isolat dan senyawa aktif terhadap hambatan β - hematin secara *in vitro* (BHIA= β -Haematin Inhibition Assay).

Uji efek isolat dan senyawa aktif terhadap hambatan β -hematin secara *in vitro* dilakukan untuk memprediksi efek senyawa aktif pada proses detoksifikasi parasit malaria. Pengujian dilakukan tanpa menggunakan biakan parasit malaria tetapi dengan larutan α -clorohemin (Sigma) dan bufer asetat (pH 5) yang dikondisikan sesuai kondisi vakuola makanan parasit malaria.

Senyawa aktif dari *A.champeden* (konsentrasi akhir 10 μ g/ml) yaitu senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R, morakhalkon A dan ME2, diinkubasi selama 24 jam bersama larutan α -clorohemin dan bufer

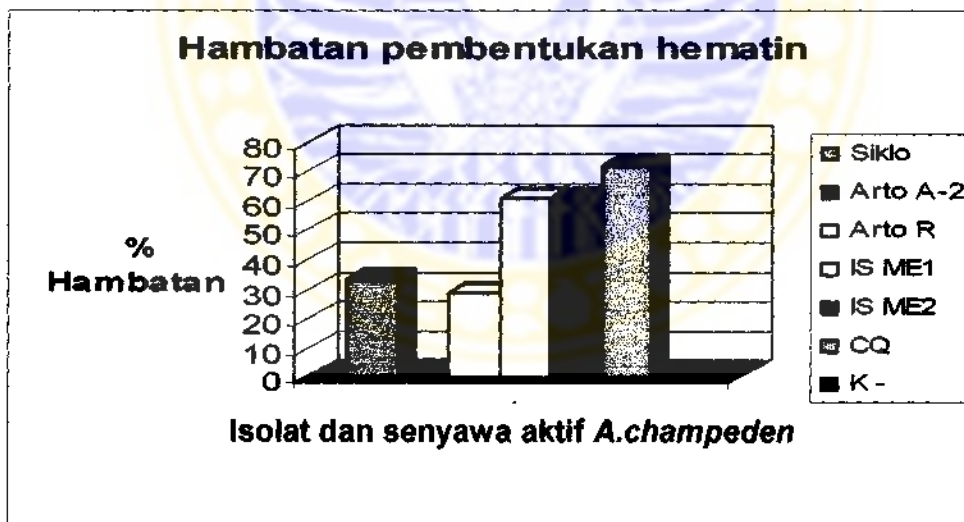
asetat (pH 5). Dalam proses uji hambatan pembentukan β -hematin, bufer asetat dengan pH 5, merupakan kondisi yang dioptimasi sesuai dengan pH vakuola makanan parasit yaitu kondisi asam (*acidic food vacuole*). Kondisi ini merupakan kondisi optimal dimana proses dimerisasi heme (detoksifikasi heme) menjadi β -hematin (struktur dimer dari hemozoin) dapat berlangsung.

Pada pengujian ini α -clorohemin akan bereaksi dengan bufer asetat setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C sehingga akan terbentuk β -hematin. Pemberian larutan NaOH pada pelet β -hematin yang terbentuk akan mengubahnya menjadi alkalin hematin yang dapat diukur dengan spektrofotometer.

Pengamatan terhadap persen hambatan pembentukan β -hematin didasarkan pada pengukuran absorbansi masing-masing zat uji yang diberikan dibandingkan dengan kontrol negatif. Perhitungan hambatan pembentukan β -hematin dari senyawa morakhalkon A sebesar $61,05 \pm 1,82\%$ dan ME2 sebesar $61,11 \pm 0,24\%$. Sedangkan pada klorokuin (kontrol positif) persen hambatan pembentukan β -hematin mencapai sekitar $71,74 \pm 3,25\%$. Selanjutnya senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan artoindonesianin R memiliki persen hambatan pembentukan β -hematin berturut-turut sebesar $33,42 \pm 6,0$, $8,10 \pm 2,28$ dan $28,69 \pm 7,18 \%$. Hasil perhitungan rata-rata persen hambatan dan histogram hambatan senyawa uji terhadap pembentukan β -hematin terlihat pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.26. di bawah ini :

Tabel 5.4. Persen hambatan pembentukan β -hematin oleh senyawa aktif *A.champeden* (β -hematin Inhibition Assay).

No.	Isolat/senyawa	% pembentukan β -Hematin	% Hambatan β -hematin	% Hambatan β -hematin
1.	Sikloheterofilin	62,34	37,66	33,42\pm 6,00
		70,83	29,17	
2.	Artoindonesianin A-2	93,51	6,49	8,10 \pm 2,28
		90,28	9,72	
3.	Artoindonesianin R	66,23	33,77	28,69 \pm 7,18
		76,39	23,61	
4.	Morakhalkon A	37,66	62,34	61,05\pm1,82
		40,26	59,76	
5.	ME2	35,06	64,94	61,11\pm0,24
		34,72	65,28	
6.	K + (Klorokuin)	25,97	74,03	71,74\pm3,25
		30,56	69,44	
7.	K-	100,0	0,00	0,00\pm0,00
		100,0	0,00	



Gambar 5.26. Grafik hambatan pembentukan β -hematin oleh senyawa aktif *A. champeden* (β -hematin Inhibition Assay).

Analisis statistik menggunakan *One way Anava* (Lampiran 5) terlihat bahwa terdapat pengaruh senyawa uji yang berbeda terhadap pembentukan β -hematin ($p=0,00 < \alpha=0,05$). Selanjutnya uji beda dengan menggunakan uji Tukey dapat dijelaskan bahwa klorokuin (kontrol positif) berpengaruh paling besar terhadap hambatan pembentukan β -hematin dan tidak berbeda pengaruhnya dengan senyawa morakhaikon A dan ME2, tetapi berbeda dengan sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R dan kontrol negatif.

Menurut Frolich (2005) senyawa yang memiliki hambatan pembentukan β -hematin lebih besar dari 60% dikatakan memiliki potensi yang tinggi sebagai inhibitor β -hematin, dan apabila presentase hambatannya lebih kecil dari 40%, merupakan inhibitor yang rendah terhadap pembentukan β -hematin.

Berdasarkan hal tersebut maka senyawa morakhaikon A dan ME2 dari ekstrak metanol kulit batang *A.champeden*, berpotensi sebagai inhibitor terhadap pembentukan β -hematin sedangkan senyawa lainnya tidak berpotensi pada pembentukan β -hematin.

Pengujian ini merupakan uji cepat (*rapid test*) mekanisme aksi isolat dan senyawa aktif terhadap hambatan pembentukan β -hematin, dan akan dikonfirmasi dengan uji biokimiawi lainnya serta ultrastruktur vakuola makanan parasit malaria.

artoindonesianin A-2 dan R, tidak berpotensi untuk menghambat proses pembentukan hemozoin dari parasit malaria tersebut.

Hal yang berbeda teramati pada ultrastruktur *P. falciparum* yang diberikan senyawa morakhalkon A pada pengamatan 6 dan 24 jam (Gambar 5.22-i-j). Pada vakuola makanan parasit malaria yang diberikan senyawa tersebut tidak terlihat adanya hemozoin. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa morakhalkon A memiliki potensi menghambat pembentukan hemozoin. Begitu juga pada stadium trofozoit parasit malaria yang diinkubasi dengan isolat ME2, pada pengamatan 6 jam terlihat bahwa pada vakuola makanan terdapat hemoglobin yang tidak didegradasi, dan pada pengamatan 24 jam, ultrastruktur vakuola makanan parasit tidak terdapat hemozoin (Gambar 5.22.k-l). Gambaran ultrastruktur yang berbeda ini diduga disebabkan 2 hal : (1) pada 6 jam inkubasi, diduga efek isolat aktif ME2 menyebabkan hemoglobin tidak dapat didegradasi menjadi heme dan globin, sehingga sampai 24 jam inkubasi vakuola makanan terlihat kosong (2). Adanya hemoglobin pada 6 jam inkubasi, merupakan awal masuknya hemoglobin ke dalam vakuola makanan parasit. Selanjutnya parasit malaria mengubah hemoglobin menjadi heme dan globin, dan efek senyawa aktif ME2 menghambat pengubahan heme bebas yang terbentuk menjadi hemozoin sehingga vakuola makanan terlihat kosong (tidak terbentuk hemozoin) setelah 24 jam.

Berdasarkan kajian ultrastruktur di atas maka, dapat diinterpretasikan bahwa senyawa morakhalkon A dan ME2 memiliki potensi untuk menghambat proses pembentukan hemozoin parasit malaria.

Berdasarkan hasil analisis efek senyawa aktif antimalaria dari *A.champeden* terhadap morfologi parasit malaria secara mikroskopik dan analisis aktivitas biokimiawi, dapat dibuat ringkasan fenomena hasil pengujian sebagai berikut :

Tabel 5.5. Fenomena efek senyawa aktif *A.champeden* terhadap morfologi dan aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan terhadap parasit malaria.

No.	Isolat dan Senyawa aktif	Perubahan morfologi		Aktivitas biokimiawi		
		LM	TEM	DH	BH	HZ
1.	Sikloheterofilin	+	-	+	-	-
2.	Artoindonesianin A-2	+	-	+	-	-
3.	Artoindonesianin R	+	-	+	-	-
4.	Morakhalkon A	+	+	+	+	+
5.	ME 2	+	+	+	+	+

Keterangan :

- LM : pengamatan dengan mikroskop cahaya
 TEM : pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi
 DH : hambatan pada degradasi Hemoglobin
 BH : hambatan pembentukan detoksifikasi heme sintetis (β -hematin)
 HZ : hambatan pembentukan hemozoin berdasarkan pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Elusidasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Isolasi dari Ekstrak Metanol Kulit Batang *Artocarpus champeden* Spreng.

Fraksinasi dan Isolasi senyawa dari ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* Spreng, menghasilkan 2 isolat flavonoid yaitu isolat ME1 dan ME2, yang diketahui berdasarkan profil kromatogram dengan adanya spot berwarna kuning sampai oranye dengan penampak noda serri-sulfat 1%. Elusidasi dan identifikasi struktur elusidasi dijelaskan sebagai berikut:

6.1.1. Elusidasi dan Identifikasi Senyawa ME1

Hasil analisis terhadap senyawa ME1, dengan metode KLT menunjukkan bercak (*spot*) tunggal pada Rf 0,40. Identifikasi menggunakan penampak noda serri sulfat menunjukkan adanya warna orange dan dengan sinar UV (365 dan 254 nm) terlihat warna coklat pudar sampai coklat gelap. Hasil ini didukung oleh data kromatogram hasil analisis dengan densitometer, yang menunjukkan bahwa terdapat puncak utama pada Rf 0,40 dengan luas area 97,99% dan puncak lain yang tidak dominan dengan Rf yang berbeda (Rf 0,08) pada panjang gelombang 365 nm dan 254 nm. Identifikasi dengan metode KLT menggunakan penampak noda menyiratkan bahwa isolat ME1 mengandung senyawa fenolik, oleh karena itu senyawa ME1

merupakan senyawa flavonoid yang memiliki gugus fenol dan bukan berasal dari golongan terpenoid (Wagner *et al*, 1984; Gibbons *et al*, 1998).

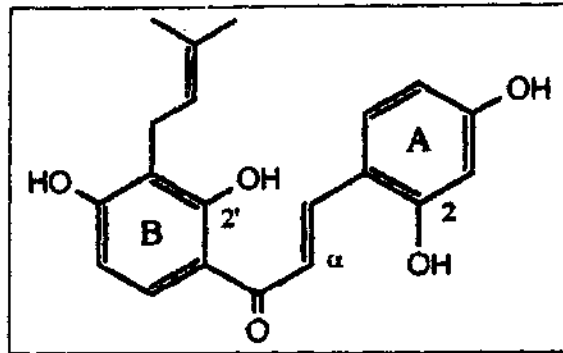
Hasil-hasil ini kemudian diidentifikasi lebih lanjut dengan berbagai metode seperti spektroskopi UV, spektroskopi Inframerah (IR), spektroskopi massa (MS) dan RMI. Identifikasi secara KLT dan penampak noda ditujukan terutama untuk memeriksa kemungkinan terkandungnya flavonoid, terpsixenoid dan senyawa fenolik lainnya di dalam senyawa tersebut.

Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometri UV menunjukkan bahwa isolat ME1 memiliki dua panjang gelombang. Dari profil spektrum UV tersebut terlihat bahwa senyawa yang terkandung pada isolat ME1 menyerap sinar UV dan menunjukkan satu atau lebih puncak dalam rentang panjang gelombang (λ_{max}) 320 - 380 nm. Senyawa yang menyerap sinar UV dalam rentang panjang gelombang 200-400 nm menunjukkan bahwa struktur molekulnya mengandung ikatan tidak jenuh, seperti diena atau poliena terkonjugasi, gugus karbonil, gugus karbonil berikatan α,β -tidak jenuh, atau suatu cincin aromatik (Markam, 1985; Fessenden *et al*, 1983). Adanya puncak spektrum pada panjang gelombang 370-410 nm juga merupakan ciri khas golongan khalkon, sedangkan puncak spektrum pada panjang gelombang antara 350-386 nm merupakan ciri khas golongan flavonol (Harborne, 1996). Oleh karena isolat ME1 yang memiliki puncak spektrum pada panjang gelombang

320 dan 380 nm, dapat diinterpretasikan bahwa isolat ME1 mengandung senyawa golongan khalkon.

Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer inframerah menunjukkan bahwa senyawa ME1 memiliki profil IR dengan pita serapan (ν_{\max}) pada 3412 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1616 dan 1384 cm^{-1} . Menurut Silverstein (1991), gugus C=O terdapat pada daerah serapan $1820\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, C=C aromatik pada 1650 cm^{-1} , O-H pada $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, dan C-H aromatik pada daerah $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$. Berdasarkan pendapat tersebut, dapat diinterpretasikan bahwa jenis dan tipe ikatan yang terdapat pada isolat ME1 yaitu adanya ikatan-ikatan C=O (1616 cm^{-1}), C=C aromatik (1659 sampai 1384 cm^{-1}), O-H (3412 cm^{-1}), dan C-H aromatik (2919 cm^{-1} dan 2850 cm^{-1}).

Selanjutnya senyawa ME1 yang diperoleh sebagai serbuk berwarna kuning, dilakukan identifikasi dengan spektra RMI ^1H , menunjukkan adanya sinyal untuk gugus isoprenil (δ 1.66 dan 1.79, masing-masing singlet (3H, 2x Me). Analisis data korelasi HMBC menunjukkan bahwa gugus isoprenil terdapat pada posisi C-3'. Berdasarkan kajian pustaka maka dapat dinyatakan bahwa spektra RMI dari senyawa ME1 ini identik dengan senyawa morakhalkon A (Monache *et al*, 1995; Han *et al*, 2006) dengan struktur sebagai berikut :



Gambar 6.1. Struktur kimia senyawa Morakhalkon A
(Monache *et al*, 1995; Han *et al*, 2006)

6.1.2. Elusidasi dan identifikasi isolat ME2

Hasil analisis terhadap isolat ME2 dengan metode KLT menunjukkan adanya bercak tunggal pada Rf 0,36. Identifikasi menggunakan penampak noda serri sulfat menunjukkan adanya warna orange dan dengan sinar UV (365 dan 254 nm) terlihat warna coklat pudar sampai coklat gelap. Hasil ini diperkuat oleh data analisis menggunakan densitometer yang menunjukkan bahwa terdapat puncak utama pada Rf 0,36 dengan luas area 96,42% dan 2 puncak lain yang tidak dominan dengan Rf yang berbeda pada kromatogram yang diperoleh pada panjang gelombang 365 nm dan 254 nm.

Identifikasi dengan metode KLT menggunakan penampak noda memperlihatkan bahwa profil isolat merupakan senyawa flavonoid yang memiliki gugus fenol dan bukan berasal dari golongan terpenoid (Wagner *et al*, 1984; Gibbons *et al*, 1998).

Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometri UV menunjukkan bahwa isolat ME2 berbeda dengan senyawa ME1. Dari profil UV terlihat bahwa isolat ME2 hanya memiliki satu panjang gelombang maksimum (λ_{\max}) yaitu 380 nm. Senyawa yang menyerap sinar UV dalam rentang panjang gelombang 200-400 nm menunjukkan bahwa struktur molekulnya mengandung ikatan tidak jenuh, seperti diena atau poliena terkonjugasi, gugus karbonil, gugus karbonil berikatan α,β -tidak jenuh, atau suatu cincin aromatik (Wagner *et al*, 1978; Fessenden *et al*, 1983).

Menurut Brown *et al* (1978) dan Fessenden *et al* (1983), senyawa yang menyerap sinar UV dalam rentang panjang gelombang 200-400 nm mengindikasikan bahwa di dalam struktur molekulnya mengandung ikatan tidak jenuh, seperti diena atau poliena terkonjugasi, gugus karbonil, gugus karbonil berikatan α,β -tidak jenuh, atau suatu cincin aromatik. Selanjutnya Harborne (1996) mengemukakan adanya maksima spektrum pada 370-410 nm merupakan ciri khas golongan khalkon. Oleh karena isolat ME2 memiliki puncak spektrum pada panjang gelombang 380 nm, maka dapat diinterpretasikan bahwa isolat ME2 mengandung senyawa golongan khalkon.

Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer inframerah menunjukkan bahwa isolat ME2 memiliki profil IR dengan pita serapan (ν_{\max}) pada 3433 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} , 1383 cm^{-1}

1616 cm^{-1} . Berdasarkan kajian pustaka tentang profil spektrum IR tersebut, dapat diinterpretasikan jenis dan tipe ikatan yang terdapat pada isolat ME2 adalah ikatan-ikatan C=O (1616 cm^{-1}), C=C aromatik (1658 sampai 1383 cm^{-1}), O-H (3433 cm^{-1}), dan ikatan C-H aromatik (2920 cm^{-1}).

Secara umum dari hasil identifikasi isolat ME2 dengan KLT penampak noda, spektrum UV dan IR, dapat dinyatakan bahwa isolat ME2 merupakan senyawa golongan khalkon.

6.2. Efek antimalaria fraksi MEII ekstrak metanol *A.champeden*

Uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* menunjukkan bahwa nilai IC_{50} fraksi ME II adalah sebesar $1,649 \pm 0,848 \mu\text{g/ml}$. Hasil ini jauh lebih kecil dari batas ideal untuk menentukan apakah suatu fraksi memiliki efek antimalaria. Suatu fraksi dikatakan memiliki efek antimalaria bila secara *in vitro* memiliki nilai IC_{50} fraksi lebih kecil dari 25 $\mu\text{g/ml}$ (Kohler, 2002). Berdasarkan acuan tersebut, maka fraksi MEII dari ekstrak metanol kulit batang *A.champeden* memiliki aktivitas antimalaria yang poten. Efek antimalaria tersebut jauh lebih besar dibanding dengan hasil uji efek antimalaria pada tingkat ekstrak dan peningkatan ini diduga disebabkan oleh semakin tingginya kadar senyawa flavonoid pada ekstrak metanol. Penelitian lain yang dilakukan juga menjelaskan bahwa adanya kandungan senyawa flavonoid dalam suatu tanaman dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria. Beberapa laporan penelitian mengenai

suatu isolat memiliki efek antimalaria yang poten secara *in vitro*. Menurut Fidock (2004), bahwa suatu senyawa yang potensial sebagai antimalaria secara *in vitro* apabila nilai IC_{50} lebih kecil dari 1 μM . Aktivitas antimalaria tertinggi diperoleh pada senyawa sikloheterofilin ($IC_{50} = 0,08 \mu M$) dan morakhalkon A ($IC_{50} = 0,28 \mu M$).

Aktivitas antimalaria yang poten dari senyawa sikloheterofilin, diduga karena adanya rantai samping isopren pada posisi C-8 yang berbeda dengan pada 4 senyawa lainnya. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan sebelumnya bahwa aktivitas antimalaria senyawa sikloheterofilin diduga karena letak rantai samping isoprenil pada posisi C-8 dari struktur flavon senyawa tersebut. Begitu juga dengan senyawa heteroflavanon ($IC_{50} = 0,001 \mu M$) yang diisolasi dari ekstrak diklorometana, memiliki rantai samping isoprenil yang menyebabkan aktivitasnya lebih kuat enam kali lipat dibandingkan dengan klorokuin difosfat ($IC_{50} = 5,8 \times 10^{-9} M$), sedangkan senyawa artonin A yang tidak memiliki gugus isoprenil memiliki aktivitas antimalaria yang kurang poten (Zaini *et al*, 2006; Widyawaruyanti *et al*, 2007).

Hal ini diperkuat dengan penelitian Cerquira *et al*, (2003) bahwa beberapa senyawa isoprenilflavon dari *Artocarpus elasticus* menunjukkan aktivitas hambatan proliferasi limfosit dan hambatan tertinggi dimiliki oleh senyawa isoprenilflavon dengan rantai isopren yang terikat pada atom C-8. Hal yang sama juga dilaporkan Wei *et al*, (2005) bahwa senyawa prenilflavon dari jenis *Artocarpus* dengan rantai isopren yang terikat pada

Oleh karena itu hasil pengujian efek senyawa aktif antimalaria dari *A.champeden* pada morfologi dan aktivitas biokimiawi pada vakuola makanan parasit malaria, merupakan acuan ilmiah untuk mengungkapkan mekanisme aksi dan target spesifik senyawa flavonoid tersebut yang menimbulkan efek antimalaria seperti yang telah dijelaskan di atas.

6.4. Efek Flavonoid Pada Aktivitas Biokimia dalam Vakuola Makanan Parasit Malaria.

6.4.1. Efek flavonoid pada proses degradasi hemoglobin

Efek senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R, morakhalkon A dan isolat ME2 dengan mekanisme aksi pada proses degradasi hemoglobin parasit, tervisualisasi pada perubahan morfologi dan analisis aktivitas biokimiawi parasit malaria.

Berdasarkan analisis morfologi *P.falciparum* yang diinkubasi dengan ke lima senyawa flavonoid tersebut menunjukkan bahwa selama inkubasi 0-12 jam, semua senyawa aktif belum memberikan efek pada morfologi parasit malaria. Hal ini terlihat pada morfologi yang sama, antara biakan parasit malaria yang diinkubasi dengan senyawa aktif dibandingkan dengan morfologi biakan parasit yang tidak diberikan senyawa aktif (kontrol negatif) pada inkubasi 0-12 jam. Pada masa inkubasi ke-12 jam, biakan *P.falciparum* stadium cincin yang diinkubasi dengan senyawa flavonoid aktif antimalaria mulai mengalami penebalan sitoplasma menjadi stadium trofozoit awal, sama dengan morfologi

Hempelmann *et al* (2003), *Plasmodium falciparum* intraeritrositik, dikelilingi oleh *parasitophorous vacuolar membrane* (PVM) yang berperan penting bagi parasit untuk mendapatkan nutrient dan eksport protein ke membran sel host.

Oleh karena itu keberadaan parasit di luar sel eritrosit (eksoeritrositik) akan memperburuk proses maturasi dan pertumbuhannya dan mengarah pada kematian parasit.

Kondisi *P.falciparum* yang berada di luar eritrosit seperti ini juga telah dilaporkan Salmon *et al* (2000). Pada kultur *P.falciparum* 3D7, W2 dan Dd2 *middle stage* shizont yang diinkubasi dengan inhibitor protease yaitu E64 (L-transepoxy-succinyl-leucylamido- (4-guanidino) butane), selama 8 jam. Pada pengamatan dengan mikroskop cahaya, terlihat bahwa stadium shizont yang diinkubasi dengan E64 sebagai inhibitor protease, berkembang menjadi merozoit yang diselubungi membran intraselular, dan berada di luar sel eritrosit. Hasil penelitian Salmon *et al* (2000) memperkuat dugaan bahwa parasit yang berada di luar eritrosit dengan dilapisi membran intraselular merupakan salah satu perubahan morfologi parasit malaria karena adanya hambatan dari senyawa aktif antimalaria.

- (3) Semua senyawa aktif antimalaria (sikloheterofilin, artoindonsianin A-2, artoindonesian R, morakhalkon A dan isolat ME2) memberikan efek terjadinya perubahan warna hemozoin menjadi berwarna hitam dan pecah (*aggregation*), pada inkubasi 36-48 jam berbeda dengan

dimana pada inkubasi 48 jam *P.falciparum* sudah mengalami satu siklus pertumbuhan kembali ke stadium cincin.

Perubahan dan kelainan morfologi mulai fase tropik 24- 48 jam juga menyebabkan tingkat parasitemia menurun, yang berarti bahwa senyawa aktif menghambat pertumbuhan parasit malaria mulai dari fase tropik (24 jam) sampai pada fase akhir siklus hidup parasit malaria (48 jam). Siklus hidup parasit yang tertunda pada fase akhir pertumbuhan juga telah dilaporkan (Rosenthal *et al*,1991; Gunawan *et al*, 2006; Malhorta, 2007).

Perubahan-perubahan morfologi yang tervisualisasi karena adanya efek senyawa flavanoid yaitu sikloheterofilin, artoindonesianin A, artoindonesianin R, morakhalkon A dan isolat ME2 yang berlangsung mulai pada periode tropik sampai akhir siklus pertumbuhan parasit disebabkan pada fase tersebut parasit malaria mulai melakukan proses metabolisme yang aktif. Pada periode tropik, parasit mulai bertambah besar dari trofozoit awal (*early trophozoite*) menjadi trofozoit dewasa (*late trophozoit*). Pengambilan sumber nutrisi dari sitosol eritrosit dikonsumsi dengan cepat di dalam vakuola makanannya yang mulai terbentuk. Proses degradasi hemoglobin menjadi oligo peptida (*small peptida*) dan heme secara proteolisis di dalam vakuola makanan mulai berlangsung (Rosenthal,1995; Gamboa *et al*,1996; Rosenthal, 1997; Wisner, 2004).

Oleh karena itu, apabila terdapat senyawa aktif antimalaria yang bersifat inhibitor pada periode ini, maka akan terjadi gangguan metabolisme parasit malaria yang tervisualisasi pada perubahan kondisi morfologinya. Hal ini diperkuat dengan pengujian biokimia yang telah dilakukan untuk mengkonfirmasi efek senyawa aktif pada morfologi parasit terkait dengan aktivitas biokimiawi pada proses degradasi globin menggunakan SDS-PAGE.

Analisis hambatan degradasi globin parasit malaria, dilakukan menggunakan *P. berghei* yang diinkubasi secara *in vitro* selama 0 -6 jam. Pada proses preparasi untuk mengisolasi protein parasit, digunakan saponin untuk melisiskan membran eritrosit yang terinfeksi parasit tetapi tidak melisiskan membran parasit (Gamboa *et al*,1996). Selanjutnya kadar protein parasit ditentukan dengan menggunakan metode Bradford. Keuntungan metode ini adalah waktu yang dibutuhkan relatif cepat dan sensitif (Deutscher,1990; Aulanni'am, 2004). Penentuan kadar ini sangat penting untuk menjaga supaya sampel yang masuk ke dalam sumur SDS-PAGE seragam sehingga akumulasi globin yang tidak terdegradasi dapat diketahui secara valid. Kemudian sejumlah konsentrasi yang sama dari protein parasit yang telah diukur, dilarutkan dalam sampel buffer SDS-PAGE dan dielektroforesis dengan menggunakan 15% gel akrilamid. Hasil SDS-PAGE terhadap akumulasi globin dapat ditunjukkan dengan adanya pita (*band*) yang berwarna hitam pada posisi 16 kDa (Rosenthal,1991).

Sifat lipofilitas tinggi karena adanya gugus isoprenil menyebabkan senyawa aktif *A.champeden* tersebut lebih mudah melewati membran eritrosit maupun membran parasit, masuk ke vakuola makanan dibandingkan senyawa yang tidak memiliki gugus isoprenil. Daerah non polar senyawa aktif yang tidak larut dalam air (gugus hidrokarbon dan prenil) dengan molekul air di sekelilingnya akan bergabung dengan ikatan hidrogen (*icebergs*). Dalam kondisi vakuola makanan yang basa dengan konsentrasi ion OH^- yang tinggi, molekul air (ikatan H) di sekeliling molekul non polar akan terdesak dan pecah, sehingga terjadilah reaksi penggabungan senyawa aktif yang non polar dengan permukaan non polar dari substrat yaitu globin melalui interaksi hidrofobik. Interaksi hidrofobik cenderung stabil sehingga dapat menghambat mekanisme biokimiawi dalam vakuola makanan parasit.

Aktivitas biokimiawi ini juga ditunjang dengan adanya gugus hidroksil yang dimiliki ke 5 senyawa aktif, yang menyebabkan senyawa flavonoid lebih mudah bereaksi dengan senyawa lain, namun mekanisme ini belum diketahui. Hal ini diasumsikan berdasarkan penelitian Messori (2006), bahwa artemisinin dalam bentuk dihidroartemisinin (memiliki 2 gugus hidroksil), gugus hidroksilnya juga berperan berikatan dengan *ferrous hemoglobin*. Selanjutnya penelitian Arung (2006) terhadap aktivitas senyawa flavonoid yang diisolasi dari *A. heterophyllus* memperkuat dugaan ini, yang menyatakan bahwa adanya

gugus hidroksil, meningkatkan aktivitas senyawa flavonoid sebagai antioksidan.

Aktivitas biokimiawi senyawa aktif antimalaria *A.champeden* diduga tidak secara langsung menghambat enzim protease yang berperan pada proses degradasi hemoglobin, tetapi diduga terjadi karena proses biokimiawi lain di dalam vakuola makanan parasit. Seperti yang telah dijelaskan yaitu sifat lipofilitas senyawa aktif dan adanya ikatan gugus hidroksil pada molekul amin menyebabkan proses degradasi globin di vakuola makanan parasit malaria menjadi terganggu. Hal ini dapat diinterpretasikan bahwa penelitian ini searah dengan pendapat Go (2004) yang menyatakan bahwa khalkon suatu flavonoid, yang aktif antimalaria menghambat degradasi hemoglobin, ternyata tidak memiliki mekanisme hambatan terhadap enzim sistein protease secara *in vitro*. Hal ini berbeda dengan beberapa penelitian terdahulu bahwa khalkon dapat menghambat degradasi globin melalui mekanisme hambatan enzim sistein protease secara komputatif (Li, 1991; Li, 1996; Biagini,2003).

Hambatan pada proses degradasi hemoglobin maupun globin juga sudah diketahui merupakan target obat antimalaria seperti klorokuin, artemisinin dan turunannya. Hal ini berarti bahwa senyawa flavonoid dari *A.champeden* dengan struktur kimia yang berbeda dengan klorokuin (alkaloid) dan artemisinin (seskuiterpen lakton), dapat menunjukkan efek yang sama terhadap parasit malaria. Namun struktur kimia yang berbeda

metmyoglobin. Hal ini berbeda dengan Messori (2006), yang melaporkan bahwa artemisinin dalam bentuk dihidroartemisinin dapat mengikat *ferrous hemoglobin* tetapi tidak dengan *methemoglobin*.

6.4.2. Efek flavonoid *A.champeden* pada proses detoksifikasi heme parasit malaria.

Efek senyawa flavonoid *A.champeden* terhadap proses detoksifikasi heme parasit malaria dikaji sesuai dengan hasil uji hambatan β -hematin secara *in vitro* dan konfirmasi ultrastuktur ada tidaknya hemozoin pada vakuola makanan *P.falciparum*. Pengujian suatu isolat dan senyawa secara *in vitro* tanpa menggunakan parasit malaria, merupakan langkah awal yang cepat dan efisien (*rapid test*) untuk menentukan target spesifik dan mekanisme aksi senyawa aktif dari bahan alam. Menurut Fidock (2004), pengujian dengan cara sintesis ini selanjutnya dapat dikonfirmasi dengan uji biokimiawi baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan menggunakan parasit.

Pada pengujian hambatan β -hematin secara *in vitro*, buffer asetat dan suhu penyimpanan berpengaruh pada pembentukan β -hematin dari heme klorida sebagai bentuk monomerik hematin. Menurut Tekwani (2005), Pada suhu penyimpanan tinggi yaitu sekitar 60⁰C dan konsentrasi buffer 4,5 M pembentukan β -hematin akan lebih cepat dibandingkan apabila disimpan pada suhu 37⁰C dengan konsentrasi yang sama, pembentukan β -hematin dapat terjadi dalam 2 hari. Pada eksperimen ini digunakan modifikasi metode oleh Egan (2005) yaitu konsentrasi

bufer asetat dinaikkan menjadi 8 M sehingga inkubasi dilakukan pada suhu yang tidak terlalu tinggi (35°C).

Berdasarkan data pengujian hambatan β -hematin secara *in vitro* dan analisis statistik (*One way Anava*) terlihat bahwa terdapat pengaruh senyawa uji yang berbeda terhadap pembentukan β -hematin ($p=0,00 < \alpha=0,05$). Selanjutnya uji beda dengan menggunakan uji Tukey dapat dijelaskan bahwa klorokuin (kontrol positif) berpengaruh paling besar terhadap hambatan pembentukan β -hematin dan tidak berbeda pengaruhnya dengan senyawa morakhalkon A dan ME2, tetapi berbeda dengan sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R. Analisis ini sesuai juga dengan pendapat Frolich (2005) bahwa senyawa yang memiliki hambatan pembentukan β -hematin lebih besar dari 60% dikatakan memiliki potensi yang tinggi sebagai inhibitor β -hematin (*good inhibitor*) dan sebaliknya presentase hambatan kurang dari 40%, merupakan inhibitor yang rendah terhadap pembentukan β -hematin.

Berdasarkan pendapat tersebut dapat dinyatakan bahwa morakhalkon A dan isolat ME2 dari ekstrak metanol memiliki potensi yang tinggi sebagai inhibitor pembentukan β -hematin, sedangkan senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R ($< 40\%$) diduga merupakan inhibitor yang rendah terhadap pembentukan β -hematin.

Hal ini diperkuat dengan konfirmasi lanjut fenomena di atas, dengan pengamatan ultrastruktur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan isolat

menjadi menjadi hemin (β -hematin). Selanjutnya terjadi proses biokristalisasi hemin (β -hematin) dengan ikatan hidrogen membentuk kristal hemozoin. Heme bebas yang tidak mengalami biokristalisasi ditransport ke sitosol parasit untuk didetoksifikasi melalui jalur *GSH dependent* (Ginsburg,1998; Ziegler, 2001; Auparakkitanon, 2003; Tekwani, 2005). Proses ini terjadi normal, karena senyawa aktif sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R tidak memiliki mekanisme hambatan pada proses detoksifikasi heme pada parasit malaria tersebut.

Temuan ini semakin diperkuat oleh kajian ultrastruktur mengenai organel sel yang terdapat pada stadium trofozoit parasit malaria yang diinkubasi dengan senyawa aktif sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R yang sama dengan ultrastruktur stadium trofozoit tanpa pemberian senyawa aktif (kontrol negatif) dibandingkan dengan kajian ultrastruktur trofozoit normal dari beberapa pustaka (Aikawa,1971; Paperna,2002).

Komperasi gambaran ultrastruktur ini menunjukkan adanya kesamaan beberapa organel sel pada stadium trofozoit yang diinkubasi dengan senyawa aktif sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R dari *A. champeden* dengan ultrastruktur trofozoit normal, seperti adanya nukleus, vakuola makanan yang berisi pigmen hemozoin dan sel parasit yang diselimuti membran luar (*outer*) dan membran dalam (*inner*). Hal ini mirip dengan ultrastruktur trofozoit normal seperti yang dikemukakan Paperna (2002), bahwa ultrastruktur trofozoit yang normal terlihat diselimuti oleh dua membran yaitu membran luar yang tebal (*outer*) dan

senyawa morakhalkon dan ME2 dari kulit batang *A. champeden* berpotensi sebagai inhibitor proses detoksifikasi heme melalui mekanisme hambatan pembentukan β -hematin, sedangkan ketiga senyawa lainnya yaitu sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R kurang potensial sebagai inhibitor proses detoksifikasi heme (Nindatu *et al*, 2007).

Potensi senyawa morakhalkon A sebagai inhibitor pada proses detoksifikasi heme, diduga karena struktur khalkon terprenilasi dari senyawa tersebut yang tidak dimiliki oleh dengan 3 senyawa lainnya yaitu sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R, dengan struktur flavon terprenilasi.

Struktur senyawa morakhalkon A dengan cincin C terbuka dan mengandung ikatan tidak jenuh menyebabkan senyawa tersebut cenderung lebih mudah bereaksi dengan substrat lain di sekelilingnya. Hal ini berbeda dengan struktur senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R yang memiliki cincin flavon yang tertutup sehingga cenderung bersifat stabil.

Potensi senyawa khalkon terprenilasi pada hambatan proses detoksifikasi heme, juga diperkuat dengan laporan penelitian tentang xanthohumol suatu senyawa khalkon terprenilasi dari tanaman hop (*Humulus lupulus* L.) family cannabaceae yang dilaporkan lebih reaktif berikatan dengan ion metal dibandingkan senyawa flavanon terprenilasi dan khalkon non-prenilasi (Miranda, 2000). Selanjutnya Frolich (2005)

juga melaporkan bahwa senyawa khalkon terprenilasi, potensial menghambat proses pembentukan hemin pada parasit malaria secara *in vitro*. Menurut beberapa pustaka diketahui bahwa khalkon terprenilasi (dengan cincin C-terbuka) memiliki kemampuan berikatan dengan ion-ion logam, singlet oksigen, radikal superoksida, radikal peroxy \cdot dan peroksinitrit (Briviba, 1994; Bors, 1997; Miranda, 2000).

Selain itu senyawa morakhalkon A dengan substitusi gugus isoprenil, menyebabkan senyawa tersebut memiliki lipofilitas yang tinggi sehingga memudahkannya melewati membran eritrosit (*parasitophorous vacuola membrane*) dan membran parasit (*parasitophorous membrane*) ke vakuola makanan sehingga mempengaruhi aktivitas biokimiawi dalam proses detoksifikasi heme .

Dari kajian ini dikemukakan bahwa senyawa tersebut akan berikatan dengan heme bebas, hasil hidrolisis hemoglobin oleh parasit malaria. Menurut Goldstein (1996), heme terdiri dari besi (Fe II) dan protoporfirin IX. Porphirin mengandung cincin datar dengan 4 atom Nitrogen yang dapat mengikat elektron bebasnya (ligan tetradentat) dengan ion Fe^{2+} . Atom Fe dengan nomor koordinasi 6, apabila berikatan dengan porfirin masih memiliki 2 elektron yang bebas. Posisi koordinasi ke-5 diisi oleh gugus polipeptida histidin (atom N), dan posisi koordinasi 6 dibiarkan terbuka untuk mengikat oksigen. Fe^{2+} pada koordinat struktur planar heme, bersifat tidak stabil dan memiliki afinitas

yang tinggi sehingga dapat berikatan dengan kation ataupun molekul yang ada disekitarnya.

Oleh karena itu, pada kondisi heme bebas (Fe^{2+} -PPIX) akan melakukan oksidasi membentuk hemin (Fe^{3+} -PPIX), di duga gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) pada cincin C struktur khalkon dengan elektron bebas (anion O^-) dan struktur senyawa yang terbuka cenderung lebih reaktif membentuk kompleks dengan heme bebas (Fe^{2+} -PPIX) tersebut sehingga tidak terjadi pengikatan oksigen oleh Fe^{2+} . Pembentukan kompleks ini akan menghambat proses oksidasi heme bebas (Fe^{2+} -PPIX) untuk membentuk hemin (Fe^{3+} -PPIX) sebagai dasar pembentukan β -hematin (bentuk dimer Fe^{3+} -PPIX dengan ikatan hidrogen). Kompleks ini akan menyebabkan sel parasit kekurangan oksigen karena tidak terjadi proses oksidasi oleh heme bebas (Fe^{2+} -PPIX). Hambatan pada proses ini menyebabkan hemozoin tidak terbentuk (*inhibition of hemozoin formation*). Hal ini sesuai dengan hasil analisis ultrastruktur senyawa morakhakon A dan ME2, yang mana tidak terdapat hemozoin di dalam vakuola makanan trofozoit *P. falciparum* sebagai indikasi adanya hambatan proses detoksifikasi heme.

Senyawa morakhakon A dengan struktur khalkon yang terbuka dan adanya substitusi gugus karbonil pada cincin C, lebih reaktif dibandingkan dengan struktur flavon yang dimiliki senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R yang cenderung lebih stabil,

sehingga ketiga senyawa ini, termasuk pada inhibitor α -hematin yang rendah.

Temuan yang menarik bahwa, berdasarkan hasil pengujian biokimiawi terhadap hambatan pembentukan β -hematin dapat dinyatakan bahwa senyawa morakhalkon A dan isolat ME2 dari kulit batang *A.champeden* ini memiliki potensi yang hampir sama dengan inhibitor spesifik klorokuin. Hal ini sangat prospektif sebagai antimalaria, karena walaupun memiliki struktur senyawa yang berbeda, namun potensi hambatannya hampir sama dan memiliki mekanisme aksi yang berbeda dengan klorokuin yang telah resisten.

Begitu juga potensi hambatan proses detoksifikasi heme yang dimiliki senyawa aktif *A.champeden*, dimiliki juga oleh artemisinin sebagai obat antimalaria yang diunggulkan menggantikan klorokuin. Namun struktur flavonoid pada *A.champeden* yang berbeda dengan klorokuin dan artemisinin memungkinkan akan terjadi mekanisme berbeda dalam proses hambatan detoksifikasi heme tersebut.

Berdasarkan kajian beberapa pustaka, mekanisme hambatan proses detoksifikasi heme dari senyawa morakhalkon A dan ME2 pada *A.champeden*, berbeda dengan yang terjadi pada klorokuin dan artemisinin.

Klorokuin dapat membentuk kompleks dengan hemin (Fe^{3+} -PPIX) yang menghambat formasi β -hematin (Constantinidis,1988; Egan,1999), dan memiliki kemampuan berikatan dengan heme bebas

(Fe^{2+} -PPIX) (Vennerstrom, 2004; Kannan, 2005). Mekanisme aksi tersebut disebabkan oleh atom klorin pada posisi 7 (7-kloro) pada rantai kuinolin dengan hemin Fe^{3+} -PPIX. Pengikatan dengan Fe^{3+} -PPIX dilaporkan memiliki daya asosiasi yang kecil (Egan,1996; Krogstad,1998;Egan,1999; Egan,2000). Sedangkan gugus samping amino alkil dilaporkan dapat berikatan kuat dengan Fe^{3+} -PPIX pada beberapa kasus tetapi efeknya tidak terlihat jelas pada aktivitasnya (Egan,2000; Famin, 2003). Mekanisme ini hambatan pembentukan formasi β -hematin oleh klorokuin ini, cenderung pada target hemin (Fe^{3+} -PPIX) sedangkan yang terjadi pada senyawa Morakhalkon A diduga pada target berbeda yaitu heme bebas (Fe^{2+} -PPIX).

Selanjutnya pada artemisinin, mekanisme hambatannya disebabkan, salah satu gugus metil (CH_2) dari dihidroartemisinin berikatan dengan rantai samping metil dari hemin (Fe^{3+} -PPIX) atau juga (Fe^{2+} -PPIX) menghasilkan radikal bebas yang toksik bagi parasit malaria. Ikatan ini akan membentuk jembatan endoperoksida dan menghasilkan radikal bebas oksigen, yang mematikan parasit malaria (Messori, 2006; Kaiser, 2007). Mekanisme artemisinin ini berbeda dengan yang terjadi pada senyawa morakhalkon A.

Di lain sisi, artemisinin sebagai obat antimalaria yang diunggulkan menggantikan klorokuin yang telah resisten dilaporkan juga memiliki mekanisme biokimiawi di luar vakuola makanan yaitu pada membran sel eritrosit terinfeksi parasit. Mekanisme aksi yang prospektif ini, telah

dilaporkan juga dimiliki oleh senyawa artoindonesianin A-2 dan R dari *A. champeden*. Hambatan pada NPP oleh senyawa artoindonesianin A-2 dan R disebabkan karena sifatnya yang lebih polar dibandingkan dengan senyawa sikloheterofilin (Widyawaruyanti, 2007^a). Oleh karena itu senyawa aktif artoindonesianin A-2 dan R, diduga memiliki target spesifik pada hambatan degradasi hemoglobin di vakuola makanan dan juga hambatan pada membran eritrosit terinfeksi parasit (NPP).

Adanya potensi senyawa morakhalkon A dan isolat ME2 dari *A. champeden* terhadap hambatan pembentukan hemozoin menyebabkan gangguan morfologi dan pertumbuhan parasit malaria. Hal ini sesuai dengan kajian beberapa pustaka bahwa hambatan detoksifikasi heme menyebabkan gangguan pertumbuhan dan kematian parasit malaria karena lisisnya membran dan terganggunya aktivitas beberapa enzim (Sherman, 1998; Ziegler, 2001; Auparakkitanon, 2003; Tekwani, 2005).

Secara umum, kajian tentang hubungan struktur senyawa dan yang menunjang terjadinya aktivitas biokimiawi pada hambatan degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme dari senyawa flavonoid *A. champeden* dibandingkan dengan obat antimalaria klorokuin dan artemisinin terlihat pada Tabel 6.1. di bawah ini :

Tabel 6.1. Hubungan struktur senyawa pada hambatan degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme senyawa flavonoid *A.champeden* dibandingkan klorokuin dan artemisinin.

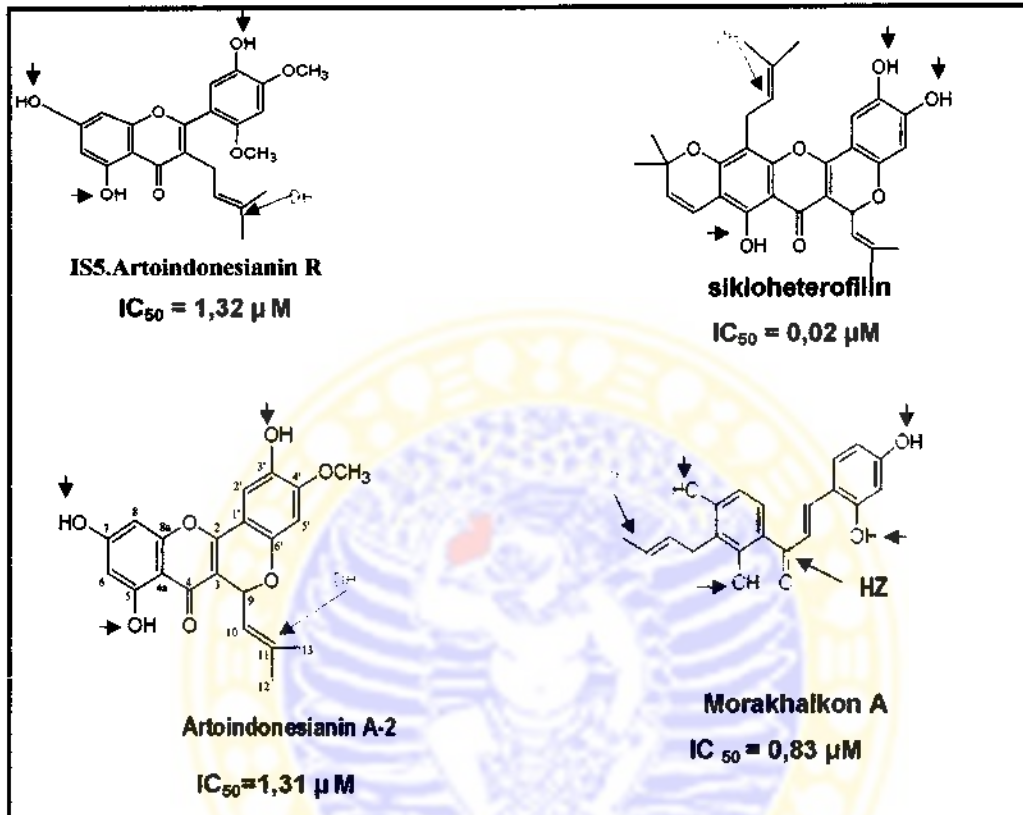
Karakteristik	Aktivitas biokimiawi pada hambatan di vakuola makanan parasit malaria		
	Senyawa aktif <i>A.champeden</i>	Klorokuin	Artemisinin
Struktur kimia	Flavon terprenilasi	alkaloid	Seskuiterpen lakton
Hambatan degradasi hemoglobin	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sifat lipofilitas gugus isoprenil menyebabkan dapat melewati membran eritrosit masuk ke vakuola makanan berikatan dengan permukaan non polar globin dengan ikatan hidrofobik. ○ Gugus hidroksil diduga berikatan dengan salah satu ujung asam amino (struktur dasar globin) yaitu gugus amin (NH^{3+}) sehingga mengganggu proses biokimiawi. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rantai samping aminoalkil N-(CH_3)₂] sebagai basa lemah - mengubah <i>pH</i> vakuola makanan menjadi alkalis dan menghambat hidrolisis hemoglobin (Sherman, 1998). ○ Menghambat aktivitas enzim sistein protease, tetapi mekanisme spesifik belum diketahui (Rosenthal, 1995; Sherman, 1998). 	<ul style="list-style-type: none"> ○ masih diperdebatkan dan kontroversial sampai saat ini (Mesnick, 1996 Pandey, 1999) ○ hambatan hemoglobin (Hb tetramer) belum banyak diketahui. (Kannan, 2005). ○ Jembatan peroksida berpengaruh mengikat <i>methemoglobin</i> dan bukan dengan <i>metmyoglobin</i>. ○ Messori (2006): <i>ferrous hemoglobin</i> tetapi tidak dengan <i>methemoglobin</i>.

Karakteristik	Aktivitas biokimiawi pada hambatan di vakuola makanan parasit malaria		
	Senyawa <i>A.champeden</i>	Klorokuin	Artemisinin
Hambatan detoksifikasi Heme	<ul style="list-style-type: none"> gugus karbonil (C=O) pada cincin B struktur khalkon yang memiliki elektron bebas O⁻ dapat membentuk kompleks dengan heme bebas (Fe²⁺-PPIX) dan menghambat pembentukan β-hematin 	<ul style="list-style-type: none"> Atom klorin (Cl⁻) pada posisi 7 (7-cloro) rantai kuinolin-menghambat formasi β-hematin dengan mengikat hemin(Fe³⁺-PPIX) dan memiliki daya assosiasinya kecil dengan hemin (Fe³⁺-PPIX) (Egan,1996; Krogstad,1998;Egan,1999 ; Egan,2000). gugus samping amino alkil dapat berikatan kuat dengan hemin (Fe³⁺-PPIX) pada beberapa kasus tetapi efeknya tidak terlihat jelas pada aktivitasnya (Egan,2000;Famin, 2003). 	<ul style="list-style-type: none"> Salah satu gugus metil (CH₃) senyawa dihidroartemisinin berikatan dengan rantai samping metil dari hemin (Fe³⁺-PPIX) atau juga dengan heme bebas (Fe²⁺-PPIX) (Messori,2006; Kaiser,2007).

Mekanisme aksi dan target spesifik senyawa flavon terpenilasi dari kulit batang *A.champeden* khususnya senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2 dan R, senyawa morakhalkon A dan isolat ME2 pada vakuola makanan yaitu hambatan pada hidrolisis globin dan detoksifikasi heme pada parasit malaria, baru pertama kali dilaporkan pada penelitian ini.

Selanjutnya berdasarkan struktur senyawa dari kulit batang *A.champeden*, pengujian aktivitas antimalaria dan pengujian biokimiawi yang dilakukan, serta kajian beberapa pustaka dapat dibuat rancangan

hubungan struktur dan aktivitas senyawa seperti pada Gambar 6.2. sebagai berikut :



Gambar 6.2. Hubungan struktur dan aktivitas senyawa *A.champeden* pada proses biokimiawi di vakuola makanan parasit malaria.

Keterangan gambar :

Substitusi rantai isoprenil dimiliki senyawa flavonoid *A.champeden* diduga berperan menghambat proses degradasi hemoglobin parasit malaria (DH). Struktur khalkon terprenilasi senyawa morakhalkon A dari ekstrak metanol selain memiliki gugus isoprenil yang berpengaruh menghambat degradasi globin (DH) juga menghasilkan anion O^- pada cincin C yang terbuka pada struktur khalkon menyebabkan senyawa ini lebih poten berikatan menghambat pembentukan β -hematin (HZ). Gugus OH yang dimiliki semua senyawa diduga berikatan pada struktur globin (\rightarrow).

Berdasarkan Gambar 6.2. terlihat bahwa pada senyawa sikloheterofilin, substitusi rantai isoprenil pada posisi C-8 berperan pada

mekanisme hambatan degradasi hemoglobin, dan efek antimalaria yang ditimbulkannya. Sedangkan senyawa artoindonesianin A-2 dan R yang memiliki substitusi gugus isoprenil pada posisi C-3, yang berperan pada mekanisme hambatan degradasi globin, dengan aktivitas antimalaria kedua senyawa ini hampir sama, namun lebih kecil dibandingkan sikloheterofilin. Hal ini berarti gugus isoprenil pada posisi C-3 tersebut kurang berperan terhadap aktivitas antimalariannya. Berdasarkan sifat kelarutannya ($\log P$) struktur kedua senyawa ini bersifat lebih polar dari senyawa sikloheterofilin sehingga dilaporkan juga memiliki mekanisme lain pada membran eritrosit terinfeksi parasit malaria (Widyawaruyanti, 2006).

Sifat biokimiawi yang sama juga dimiliki senyawa morakhalkon A dari ekstrak metanol dengan struktur kalkhon terprenilasi pada atom C-3' dari cincin A yang meningkatkan sifat lipofilitasnya sehingga dapat sampai ke vakuola makanan dengan konsentrasi yang maksimal, dan mengganggu proses biokimiawi di dalam vakuola makanan parasit. Hal spesifik dari struktur senyawa morakhalkon A yaitu gugus karboksil ($C=O$) yang terikat pada cincin C dari struktur khalkon yang bersifat lebih mudah bereaksi dibandingkan gugus karbonil pada struktur flavon yang cenderung stabil. Gugus karbonil akan menghasilkan elektron bebas (anion O^-) yang dapat membentuk kompleks dengan heme bebas (Fe^{2+} -PPIX). Mekanisme ini juga berpengaruh pada aktivitas antimalaria yang poten dari senyawa ini.

Mengacu pada kajian hubungan struktur aktivitas suatu senyawa aktif terlihat bahwa adanya persamaan ataupun perbedaan aktivitas biologis senyawa aktif, baik yang mempunyai hubungan struktur kimia sama ataupun tidak, ternyata dipengaruhi oleh sifat kimia fisika dan sistem biologis tubuh yang kompleks.

Menurut Siswandono dkk, (1998) bahwa, sifat-sifat kimia fisika memegang peran penting dalam pengangkutan obat untuk mencapai reseptor. Hanya obat-obat yang mempunyai struktur dengan kespesifikan tinggi saja yang dapat berinteraksi dengan reseptor biologis. Sifat-sifat lipofilik, elektronik dan sterik suatu gugus atau senyawa merupakan hal penting dalam menentukan aktivitas biologis tersebut.

6.5. Prospek senyawa flavonoid aktif antimalaria dari *A.champeden* terhadap patogenesis penyakit malaria.

Efek senyawa aktif flavonoid sebagai antimalaria baru, dengan mekanisme aksi pada hambatan proses degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme, merupakan temuan yang prospektif dalam meminimalkan patogenis penyakit malaria.

Hambatan ke lima senyawa flavonoid dari *A.champeden* ini pada pertumbuhan *P.falciparum* berdampak pada terjadinya penurunan tingkat parasitemia. Tingkat parasitemia parasit malaria terkait dengan persentase infeksi parasit pada sel eritrosit. Menurunnya tingkat parasitemia menyebabkan makin kecil jumlah parasit malaria yang menginfeksi sel eritrosit host pada fase eritrositik. Hal ini akan

mengurangi terjadinya reinfeksi yaitu pecahnya shizont menghasilkan stadium cincin baru. Pada saat reinfeksi, akan muncul gejala umum penderita malaria yaitu panas dan demam yang tinggi. Selain itu akan terjadi anemia. Anemia terjadi karena pada pertumbuhan dan maturasi parasit sekitar 60-80% hemoglobin host dihidrolisis untuk memenuhi nutrisinya. Dalam kaitan dengan hal tersebut, senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R, morakhalkon A dan isolat yang dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria pada dosis yang efektif, jelas berdampak juga mengurangi gejala penyakit yang ditimbulkan parasit tersebut, sehingga gejala penyakit dapat diminimalkan

Berdasarkan analisis morfologi, diketahui bahwa senyawa aktif flavonoid dapat menyebabkan lambatnya pertumbuhan parasit malaria mulai pada 24 jam sebagai stadium awal pembentukan trofozoit. Hambatan senyawa aktif flavonoid pada fase tropik dimana pertumbuhan parasit dari trofozoit dan shizont tidak membentuk stadium cincin, sangat prospektif, karena dapat dikembangkan sebagai obat antimalaria yang berefek shizontosidal darah (*blood schizontocidal effect*). Efek ini lebih diperkuat karena senyawa flavonoid *A.champeden* dapat menghambat proses degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme dimana mekanisme ini terjadi pada fase trofozoit, yang secara langsung menghambat pembentukan shizont. Hal ini sesuai dengan pendapat Tripathi *et al*, (2001) bahwa obat antimalaria yang berefek shizontosidal darah (*blood schizontocidal effect*) bekerja menghambat proses

degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme. Obat antimalaria yang bersifat shizontosidal umumnya lebih efektif meminimalkan gejala malaria dibandingkan obat antimalaria dengan efek gametosidal. Obat antimalaria dengan efek schizontosidal akan menghambat pembentukan stadium trofozoit dan shizont sehingga meminimalkan terbentuk stadium cincin yang dapat menimbulkan reinfeksi. Dengan demikian akan menyebabkan tingkat parasitemia menurun dan meminimalkan timbulnya demam pada penderita malaria karena pecahnya eritrosit dan terjadinya reinfeksi.

Hal ini diperkuat dengan aktivitas biokimiawi ke lima senyawa flavonoid tersebut yaitu mekanisme aksinya pada proses degradasi globin yang menyebabkan asam amino tidak terbentuk, proses sintesa protein terganggu dan mengakibatkan terhambatnya suplai energi bagi kelangsungan hidup parasit dan pertahanan imunologiknya.

Pada proses hidrolisis globin, asam amino yang dihasilkan parasit kemudian ditranspor ke sitosol untuk proses sintesa protein. Hasil sintesa protein merupakan sumber energi bagi pertumbuhan dan pematangannya, dan sebagian akan diekspor ke permukaan eritrosit terinfeksi untuk membentuk antigen permukaan (*PIEMP1= P.falciparum erythrocyte membrane protein 1*) dimana berperan juga *Knob-associated histidine-rich protein (KAHRP)*. Protein tersebut merupakan antigen transporter permukaan membran parasit yang berasosiasi di bawah knob (Sherman, 1998, Wickham *et al*, 2001) merupakan cara parasit untuk menghindar

dari serangan imunologik host (Senczuk *et al*, 2001; Wisner, 2004). Selain itu terjadi juga *sequestration* dan *rosetting* pada permukaan eritrosit yang tidak terinfeksi dan menyebabkan terjadinya variasi antigen. Terbentuknya sistem ini merupakan faktor utama virulens yang signifikan dengan terbentuknya respons antibodi parasit (Sherman, 1998; Rowe *et al*, 1997; Kyes *et al*, 1999). Keadaan ini pada penderita malaria menyebabkan polimorfisme parasit tinggi, dapat memproteksi imunitas host dan menimbulkan kesulitan dalam pengobatan malaria.

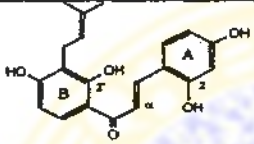
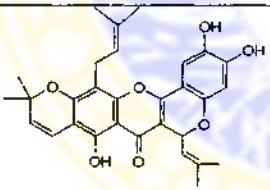
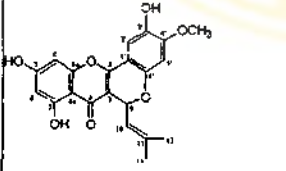
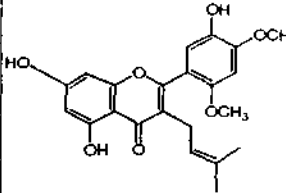
Selain berperan membentuk antigen permukaan membran eritrosit *PfEMP1* juga berkontribusi pada pembentukan knob yang meningkatkan patogenik parasit. Parasit yang memiliki knob menyebabkan terjadinya *cytoadherence* yaitu menempelnya parasit pada sel-sel endotel, dan bila terjadi pada organ vital seperti otak, jantung dan paru-paru, dapat menyebabkan obstruksi pada aliran darah vaskular dan kerusakan jaringan sel. Hal ini merupakan penyebab utama kematian karena malaria (Kyes *et al*, 1999; Wisner, 2000). Oleh karena itu hambatan senyawa aktif *A. champeden* yaitu sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonsianin R, morakhalkon A dan ME2 pada proses degradasi hemoglobin merupakan target potensial obat antimalaria. Hambatan ini menyebabkan asam amino yang dibutuhkan untuk suplai energi dan penyusunan *PfEMP1* akan terganggu, sehingga dapat meminimalkan akibat patogenik yang dapat ditimbulkan parasit malaria.

Selanjutnya hambatan senyawa aktif morakhalkon A dan isolat ME2 pada proses detoksifikasi heme juga merupakan target obat yang potensial. Hal ini sesuai dengan kajian beberapa pustaka bahwa hambatan detoksifikasi heme menyebabkan gangguan pertumbuhan dan kematian parasit malaria karena lisisnya membran dan terganggunya aktivitas beberapa enzim (Sherman,1998; Ziegler *et al*, 2001; Auparakkitanon *et al*, 2003; Tekwani and Walker, 2005).

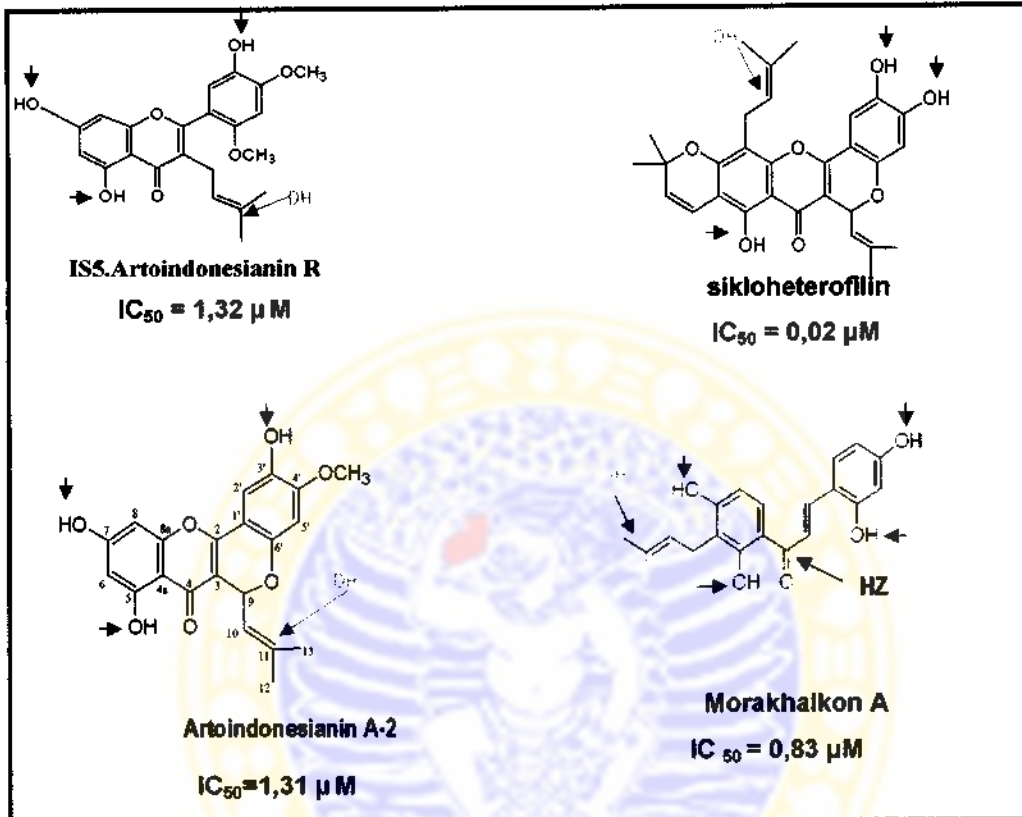
Mekanisme ini berpengaruh positif yaitu menurunkan tingkat parasitemia sehingga meminimalkan patogenitas malaria. Disamping itu terhambatnya proses pembentukan hemozoin karena hambatan senyawa aktif, akan mengurangi penumpukan hemozoin di limpa dan hati penderita, sebagai penyebab terjadinya hepatomegali.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dikemukakan bahwa ke 5 senyawa flavonoid dari *A.champeden* memiliki aktivitas antimalaria dengan target spesifik pada hambatan degradasi globin dan detoksifikasi heme serta mekanisme lain yang belum diketahui (Tabel 6.2 dan Gambar 6.3).

Tabel 6.2. Target spesifik isolat dan senyawa kulit batang *A.champeden* pada vakuola makanan parasit malaria.

Isolat/ senyawa	Struktur kimia	Gugus aktif	Target spesifik pada vakuola makanan		Mekanisme lain
			Hambatan degradasi hemoglobin	Hambatan detoksifikasi heme	
morakhalkon A		-khalkon Terprenilasi -gugus C=O -gugus OH	+	+	
ME2 (golongan karbonil dengan gugus hidroksil dan aromatik)	-	Gugus hidroksil	+	+	
Sikloheterofilin		-flavon terprenilasi - gugus OH	+	-	
Artoindonesianin A-2		flavon terprenilasi - gugus OH	+	-	NPP (Widyawarayan tl. 2007*)
Artoindonesianin R		-flavon terprenilasi - gugus OH	+	-	NPP (Widyawarayan, 2007*)

hubungan struktur dan aktivitas senyawa seperti pada Gambar 6.2. sebagai berikut :



Gambar 6.2. Hubungan struktur dan aktivitas senyawa *A.champeden* pada proses biokimiawi di vakuola makanan parasit malaria.

Keterangan gambar :

Substitusi rantai isoprenil dimiliki senyawa flavonoid *A.champeden* diduga berperan menghambat proses degradasi hemoglobin parasit malaria (DH). Struktur khalkon terprenilasi senyawa morakhalkon A dari ekstrak metanol selain memiliki gugus isoprenil yang berpengaruh menghambat degradasi globin (DH) juga menghasilkan anion O^- pada cincin C yang terbuka pada struktur khalkon menyebabkan senyawa ini lebih poten berikatan menghambat pembentukan β -hematin (HZ). Gugus OH yang dimiliki semua senyawa diduga berikatan pada struktur globin (\rightarrow).

Berdasarkan Gambar 6.2. terlihat bahwa pada senyawa sikloheterofilin, substitusi rantai isoprenil pada posisi C-8 berperan pada

Menurut Siswandono (1998) bahwa, sifat-sifat kimia fisika memegang peran penting dalam pengangkutan obat untuk mencapai reseptor. Hanya obat-obat yang mempunyai struktur dengan kespesifikan tinggi saja yang dapat berinteraksi dengan reseptor biologis. Sifat-sifat lipofilik, elektronik dan sterik suatu gugus atau senyawa merupakan hal penting dalam menentukan aktivitas biologis tersebut.

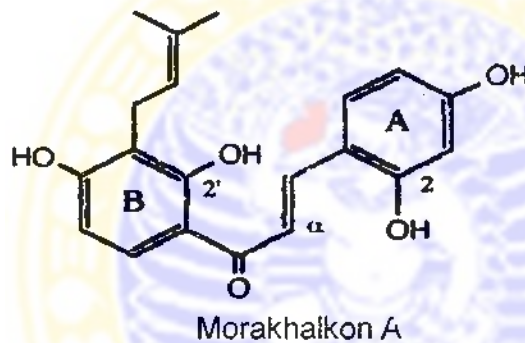
Berdasarkan konsep ini dapat diinterpretasikan bahwa senyawa sikloheterofilin memiliki struktur kimia dengan kespesifikan tinggi, sehingga dapat berinteraksi dengan reseptor pada dosis yang maksimal sehingga menimbulkan efek antimalaria yang lebih tinggi dibandingkan isolat dan senyawa lainnya. Begitu juga senyawa morakhalkon A memiliki kespesifikan tinggi sehingga dapat berinteraksi dengan parasit malaria dan menimbulkan hambatan baik pada proses degradasi hemoglobin maupun detoksifikasi heme. Oleh karena itu senyawa flavonoid dari kulit batang *A.champeden* yang memiliki efek antimalaria poten dan aktivitas biokimiawi yang spesifik sangat prospektif dikembangkan sebagai obat antimalaria baru.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Isolasi senyawa flavonoid dari kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng) menghasilkan 2 senyawa flavonoid dari ekstrak metanol yaitu senyawa morakhalkon A yang baru pertama kali dilaporkan pada *A. champeden* Spreng dan isolat ME2 sebagai golongan khaikon yang keduanya aktif sebagai antimalaria.



2. Pemberian senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R, morakhalkon A dan ME2 dari *A. champeden* berpengaruh pada stadium trophozoit awal dan menyebabkan perubahan morfologi parasit malaria yang teramati pada inkubasi 24-48 jam dimana terhambatnya stadium trophozoit dan shizont.
3. Senyawa sikloheterofilin, artoindonesianin A-2, artoindonesianin R dari kulit batang *A. champeden*, merupakan inhibitor pada proses degradasi hemoglobin parasit malaria, yang potensinya diduga dimediasi oleh substitusi gugus isoprenil dan gugus hidroksil.

DAFTAR PUSTAKA

- Abo KA , Kinghorn AD,2003. Isolation of an Anti-tumor terpenoid stem bsrk of *Spondiatius preussi* var *preussi*. **Afr J Med Sci** 32 (2): 179-182
- Achmad SA, Hakim EH, Juliawaty LD, Makmur L, Suyatno, 1996. A New Prenylated Flavone from *Artocarpus champeden*. **Nature** 9 : 878-879
- Achmad SA, 2004. Empat Puluh Tahun Dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuh-Tumbuhan Tropika Indonesia : Rekoleksi Dan Prospek. **Bull Soc Nat Prod Chem** 4 : 35-54
- Achmad SA,1986. **Buku Materi Pokok Kimia Organik Bahan Alam**. Jakarta : Universitas Terbuka, Karunika.
- Agriana RH, 2003. Uji aktivitas antimalaria fraksi kloroform kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*) terhadap *Plasmodium berghei* *in-vivo*. **Skripsi**, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.
- Ahmed MS, Galal AM, Ross SA, Ferreira D, Elsohly MA, Ibrahim AS, Mossa JS and El-Ferali FS, 2001. A weakly antimalarial biflavonone from *Rhus retinorrhoea*. **Phytochemistry**, 58 (4) : 599-602.
- Aikawa M, 1971. Parasitological review. Plasmodium : The Fine structure of malaria parasites. **Experiment Parasitol** 30: 284-320.
- Arung ET, Shimizu K, Kondo R, 2006. Inhibitory effect of Artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. **Biol Pharm Bull** 29 (9) 1966—1969 .
- Auparakkitanon S, Noonpakdee W, Ralph RK, Denny WA, Walairat P, 2003. Antimalarial 9-Anilinoacridine compound directed at hematin. **Antimicrob agent Chemother** 47 (12) : 3708-3712.
- Aulanni'am, 2004, **Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul**, Cetakan Pertama, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press, Malang, Indonesia, hal 46-56
- Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klemba M, Goldberg DE, 2002. Four Plasmepsin are active in *Plasmodium falciparum* food vacuola including a protease with an active site histidine. **Proc Natl Acad Sci USA** 9 : 990-995.

- Backer CA, Backhuizen Van Den Brink BC, 1965. **Flora of Java Vol. II** Groningen The Netherland: NVP Noordhoff, pp 19.
- Basilico, N, Pagani E, Monti D, 1998. A microtitrebased method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. **J Antimicrob Chemother** 42, 55–60.
- Biagini GA, O'Neill, Nzila PM, Ward SA, 2003. Antimalarial chemotherapy : young guns or back to the future, **Trends in Parasitol** 19 (11) : 479-487
- Bilia AR, Melilo de Malgalhaes P, Berganzi MC, Vincieri FF, 2006. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extract of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and selected cultivar. **J Phyto Med** 13 (7) : 487-493.
- Birago C, Pace T, Picci L, Pizzi, E, Scotti R, Ponzi M, 1999. The putative gene for the first enzyme of glutathione biosynthesis in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol** 99 :33-40.
- Bjorge S, 2004. Strategic Plan to Roll Back Malaria in SE Asia Region. WHO, **Proceeding Symposium of Malaria Control in Indonesia**, November 29-30, 2004. Kerjasama TDC Universitas Airlangga dan JICA, pp 14-30.
- Blackman MJ, 2004. Protease in host cell invasion by malaria parasite. **Cell Microbiol** 6 (10): 893-903.
- Boonlaksiri C, Oonanant W, Kongsaree P, Kittakoo P, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y, 2000. An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*. **Phytochemistry** 54: 415-417.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K, 1997. Antioxidant effect of flavonoid. **Bio factors** 6: 399-402.
- Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL, 2003. The transcriptom of the Intraerythrocytic developmental cycle of *P. falciparum*, **PlosBiol**1(1):e5 [oi:10.1371/journal.pbio.000005](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.000005) (10 Januari 2007)
- Bozzola JJ, Russell LD, 1999. **Electron Microscopy principles and techniques for biologists**, 2nd, Jones and Barlet Publisher Sudbury Massachusetts, pp 1-261.

- Brandao MG, Kretzli AU, Soares LS, Nery CG, Marinuzzi HC, 1997. Antimalarial activity of extracts and fraction from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **J Ethnopharmacol** 57 (2) : 131-138
- Briviba K, Sirs H, 1994. **Nonenzymatic antioxidant defence systems. In natural antioxidant in human health and diseases.** Academic Press: San Diego,CA; pp 107-128.
- Budimulja AS, Syafruddin, Tapchaisri P, Wilariat P, Marzuki S, 1996. The sensitivity of *Plasmodium* protein synthesis to prokaryotic ribosomal inhibitors. **Mol Biochem Parasitol** October :137-141.
- Burke E, Deasy J, Hasson R, McCormack R, Randhawa V, Walsh P, 2003. Antimalarial drug from nature, **J Trinity Student Med** <http://www.google.com/search?q=Burke+antimalarial+drug+in+nature&btnG=Search&hl=en>.
- Cerqueira F, Corderio Da-Silva A, Araujo N, Cidade H, Kijjoa A, Nasjimento MSJ, 2003. Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: Artelastin as a potent inhibitor. **Life Sci** 73:2321-2334.
- Chen M, Theander TG, Christensen SB, Hviid L, Zhai L, Kharazmi A, 1994. Licochalcone A, a new antimalarial agent inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *Plasmodium yoelii* infection. **Antimicrob Chemother** 38 (7) : 1470-1475.
- Chung MI, Lu CM, Huang PL, Lin CN, 1995. Prenylflavonoids of *Artocarpus heterophyllus*. **Phytochemistry** 40: 1279—1282
- Cooke BM, Lingelbach K, Lawrence HB, Leann T, 2004. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells, **trend parasitol** 20(12): 581-589
- Daily JP, Roberts C, Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wirth DF, 2003. Prevalence of *Plasmodium falciparum* *pfcr* Polimorphisms and in vitro cloroquine sensitivity in Senegal. **J Parasitol** 126 : 401- 405.
- DepKes, 2004. **Penggunaan artemisinin untuk atasi malaria di daerah yang resisten klorokuin.** Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, [http:// www.lipi.go.id](http://www.lipi.go.id).
- Depkes RI, 1987. **Analisis Obat Tradisional.** Jilid I : 43-52.

- Famin O, Ginsburg H, 2003. The treatment of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes with chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of parasite's 6-phosphogluconate dehydrogenase, **J Parasite** 10 (1): 39-50.
- Francis SE, Sullivan DJ, Golberg DE, 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Ann Rev Microbiol** 51: 97-123.
- Frolich S, Schuberth C, Bienzle U, Siems KJ, 2005. In vitro antiplasmodial activity of prenylated chalcon derivatives and their interaction with haemin. **J Antimicrob Chemother** 55 : 883-887.
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S, 2004. Antimalarial drug discovery : Efficacy models for compound screening, Review, **Nature** 3 (Juni) : 509-520.
- Gamboa de Dominguez ND, Rosenthal PJ, 1996, Cysteine protease inhibitor block early steps in hemoglobin degradation by culture malaria parasite, **Blood** 87(10): 4448-4454
- Gandahusada S, Pribadi W, Iahude HD, 1990. **Parasitologi Kedokteran**, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 125-155.
- Gero AM, 2003. New malaria chemotherapy developed by utilization of a unique parasite transport system. **J Curr Pharm** 9: 867-877.
- Ginsburg H, Krugliak M, Eidelman O, Cabantchikm ZI, 1983. New Permeability pathways induced membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **Mol Biochem Parasitol** 8 : 177-190.
- Ginsburg H, Kurtner S, Krugliak M, Cabantchik Z, 1985. Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. **Mol Biochem Parasitol** 14 : 312-322
- Ginsburg H, Stein WD, Kinetic modelling of chloroquine uptake by malaria-infected erythrocytes. Assessment of the factors that may determine drug resistance. **J Biochem Pharmacol** 41: 1463-1470.
- Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M, 1998. Inhibition of glutathion-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. **Biochem Pharmacol** 56 :1305-1313.

- Gilles HM, Warrell, 1993. **Bruce Chwatt's essential malariologi**, 3th ed, Newjork : Oxford University Press Inc, pp 164-195.
- Go ML, Liu M, Wilairat P, Rosenthal PJ, Saliba JS, Kirk K, 2004. Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **Antimicrob Agent Chemother** 48 (9) : 3241- 3245.
- Goldie P, Roth EF, Oppenheim J, Vanderberg JP, 1990. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hemozoin, **Am J Trop Med Hyg** 43 (6) :584-596.
- Goldstein GW, McGilvery RW, 1996. **Biokimiawi suatu pendekatan fungsional**, (Sumarno TM dan Suryohudoyo P penerjemah). Airlangga University Press. pp 267-375, 726-741
- Greebaum DC, Mackey Z, hansell E, Doyle P, Gut J, Caffrey CR, Lehrman JL, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Chibale K, 2004. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cystein protease inhibitor against *Plasmodium falciparum* *Tripanosoma brucei*, and *Tripanosoma cruzi*. **J Med Chem** 47 : 3212-3219.
- Gritter, R.J. 1991 (Terjemahan Padmawinata). **Pengantar Kromatografi**. Edisi III. Bandung, ITB.
- Hakim EH, 1998. Artokarpin dan heteroflavanon-A, dua senyawa flavonoid bioaktif dari *Artocarpus champeden*, **Laporan Penelitian**, Lembaga Penelitian ITB, Bandung.
- Hakim EH, Achmad SA, Juliawaty LD, Makmur L, Syah YM, Aimi N, Kitajima M., Takayama H., Ghisalberi EH, 2006. Prenylated flavonoids and related compounds of the Indonesian *Artocarpus* (Moraceae). **J Nat Med** 60: 161-184.
- Hakim EH, Fahriyati A, Kau MS, Achmad SA, Makmur L, Ghisalberti EL, Nomura T, 1999. Artoindonesianins A and B, two prenylated flavones from the root of *Artocarpus champeden*. **J Nat Pro** 62 : 613-615.
- Han AR, King YJ, Windono T, Lee SK, Seo EK, 2006. Prenylated flavonoids from the heartwood of *Artocarpus communis* with inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. **J Nat Prod** 69 : 719-721.

- Hanspal M, Dua M, Takakuwa Y, Chishti AH and Mizuno A, 2002. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyt membrane skeletal proteins at late stages of parasite development, **Blood J 100 (3) : 1048-1054.**
- Harijanto PN, 2000. **Malaria : Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi klinis dan penanganan**, Ed 1, Jakarta : EGC.
- Harborne JB, Williams CA, 1998. Anthocyanins and other flavonoids. **Nat Prod Report**, pp 631-652
- Harborne JB, 1996. **Metode Fitokimia : Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan** (Terjemahan Kosasih P dan Iwang S), Ed 2, Bandung : Institut Teknologi Bandung, hlm 234-259.
- Hefman E, 1975. **Chromatography**. 3th Edition. New York : Van Norstan Rein Comp, pp. 81-85, 638-648.
- Hempelmann E, Egan TJ, 2002. Detoxification of heme and ROI. <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/fv.html>. 10 Agustus 2006.
- Hempelmann E, Marques HM, 1994. Analysis of malaria pigment from *Plasmodium falciparum*. **JPM 32 (1): 25-30.**
- Hempelmann E, Motta C, Hughes R, Ward SA, Bray GP, 2003. *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? **Trend Parasitol 19 (1) : 23-26.**
- Heyne K, 1987. **Tumbuhan berguna Indonesia II**. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan. Jakarta : Yayasan Sarana Wana Jaya, hlm 669-670.
- International Development Research Center, 1996. **Statistic on malaria**. <http://www.idrc.ca/books/reports/1996/01-07.html>, 7 Maret 2002.
- Iwasaki T, Ogata Y, 1995. **Medicinal herbs index in Indonesia**, 2nd ed. Indonesia: PT. Eisai.
- Kaiser M, Witllin S, Nehrbass-Stuedli A, Dong Y, Wang X, Hemphill A, Matile H, Brun R, Vennerstrom JL, 2007. Peroxide bond-dependent antiplasmodial specificity of artemisinin and OZ277 (RBx11160). **Antimicrob Agent Chemoter 51 (8): 2991-2993.**

- Lee BJ, Singh A, Chiang P, Kemp SJ, Golman EA, Weinhouse MI, Vlasuk GP and Rosenthal PJ, 2003. Antimalarial activity of novel synthetic cysteine protease inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother** 47(12): 3810-3814.
- Lee D, Bhat KPL, Fong HHS, Fransworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn AD, 2001. Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. **J Nat Prod** 64 (10): 1286-1293.
- Li R, Chen X, Gong B, Dominguez JN, Davidson E, 1991. In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. **J Med Chem** 38 : 5031-5037.
- Lim SB, Chua CT, Hashim OH, 1997. Isolation of a mannose-binding and IgE- and IgM-reactive lectin from the seeds of *Actocarpus integer*. **J Immunol Methods** 209: 177-186.
- Loyola LA, Borquez J, Morales G, San-Martin A, Darias J, Flores N, Gimenez A, 2004. Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. **Phytochemistry** 65(13):1931-5.
- Lu CM, Lin CN, 1994. Flavonoids and 9-hydroxytridecyl docosanoate from *Artocarpus heterophyllus*, **Phytochemistry** 35 : 781-783.
- Ma CM, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T and Otake T, 2002. Inhibitor Effects of triterpen-azidothymidine conjugates on proliferation of human immunodeficiency virus type 1 and its protease. **Chem Pharm Bull** 50(6):877-80.
- Magowan C, Brown JT, Liang J, Heck J, Coppel RL, Mohandas N and Ilse WM, 1997. Intracellular structures of normal and aberrant *Plasmodium falciparum* malaria parasites imaged by Soft x-ray microscopy. **Proc Natl Acad Sci** 94 : 6222-6227.
- Malhorta P, 2007. Role(s) of cysteine protease and PfTSS in asexual blood stages of malaria parasites. **Malaria symposium and establishment of the Indonesian malaria research network (IMRNet)**, Jakarta.
- Markham KR, 1981. Cara mengidentifikasi Flavonoid. Bandung : ITB, pp 1-37
- Messori L, Gabbiani C, Casini A, Siragusa M, Vincieri FF, Billa AR, 2006. The reaction of artemisinins with hemoglobin : A unified picture. **J Bioinorganic Med Chem** 14 (9) : 2972- 2977.

- Miranda CL, Stevens, J F, Helmrich, A, 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hop (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. **Food Chem Toxico** 37, 271–85.
- Miranda CL, Stevens, J F, Ivanov, V, 2000. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. **J Agric Food Chem** 48 (9):3876-3884.
- Monache GD, de Rosa MC, Scurria R, Vitali A, Cuteri A, Monacelli B, Pasqua G, Botta B, 1995. Comparison between metabolite productions in cell culture and in whole plant of *Maclura pomifera*. **Phytochemistry** 39 (3): 575-580.
- Mubin AH, Pain S, 1992. Malaria tropika dengan beberapa komplikasi . **Cermin Dunia Ked** 74: 78.
- Mulya M, Suharman, 1995. **Analisis instrumental**. Surabaya : Airlangga University Press, hlm 237.
- Mustofa, 2003. Naturally Occuring Antimalarial Molecules : The potency and problems in the development of new drug for malaria, **Majalah Obat Tradisional**, 8 (26) : 8-18.
- Na BK, Shenai BR, Sijwali PS, Choe Y, Pandey KC, Singh A, Craik CS and Rosenthal PJ, 2004. Identification and biochemical characterization of vivapains, cysteine protease of malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Biochemistry** 378 : 529-538.
- Nakamura N, 2004. Inhibitor effects of some tradisional medicine on ploriferation of HIV-1 and protease, **Yakugaku zasshi** 124 (8) 519-29.
- Nindatu M, Widyawaruyanti A, Syafruddin D, Dahlan YP, Kadota S, Zaini NC, 2007. Effect of isoprenylated compound isolated from *Artocarpus chameden* on *Plasmodium falciparum* in vitro : ultrastructural study. Poster presentation, USM Malaysia- Airlangga University collaborative Conference, Biotechnology and Pharmaceutical: Enhancing the quality life, 3th-14th June, 2007.
- Noedl, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH, 2003. Malaria Drug Sensivity Testing: New Assay, New Perspectives. **J Trends Parasitol** 19(4): 175-181.

- Noster S, Kraus IJ, 1990. In vitro antimalarial activity of *Cautarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extract on *Plasmodium falciparum*. **Planta Med** 56 (1): 63-65.
- Oliveira FQ, Andrade NV, Krettli AU and Brandao MG, 2004. New evidences of malaria activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **J Ethnopharma** 93 (1) : 39-42.
- Olliaro PL, Goldberg DE, 1995. The Plasmodium digestive vacuola : metabolic headquarters and choise drug target. **Parasitol Today** 11 (8) : 294- 297.
- Olliaro PL, Taylor WR, 2004. Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant falciparum malaria : A Review. **J Postgraduate Med** 50 (1) : 40-44.
- Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL and Chauhan VS, 1999. Artemisinin, an endoperoxide antimalaria, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malaria parasite. **J Biol Chem** 274 (27) : 1983-1988.
- Panyim S, Wilairat P, Yuthavong Y, 1985, **Application of Genetic Engineering to Research on Tropical Disease Pathogens with Special Reference to Plasmodia**, A Laboratory Manual of Selected Techniques, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR) and Mahidol University, Bangkok, Thailand, 229-236.
- Paperna I, Lainson R, 2002. Fine structure of erythrocytic stages of a *Plasmodium tropiduri*-like malaria parasite found in the lizard *Kentropyx calcarata* (Teiidae) from north Brazil. **Folia Parasitol** 49: 2-8.
- Parenti P, Pizzigoni A, Hanozet G, Hakim EH, Makmur L, Achmad SA, Giordana B, 1998. A new prenylated flavone from *Artocarpus champeden* inhibits the K⁺-dependent amino acid transport in *Bombyx mori* midgut, **Biochem Biophys Research Communic** 244: 445-448.
- Peters W, 1970. **Techniques of drug evaluation I : primary screening**. In: **Chemotherapy and drug resistance in malaria**. London: Academic Press.
- Phillipson JD, Wright CW, 1991. Antiprotozoal agents plant sources. **Planta Med** 57 (1): 53-59.

- Saliba KJ, Kirk K, 1998. Uptake of an antiplasmodial protease inhibitor into *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes via a parasite-induced pathway. **Mol Biochem parasitol** 94 : 297-301.
- Salmon BL, Oksman A, Goldberg DE, 2000. Malaria parasite exit from host erythrocyte: A two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. **Proc Natl Acad sci (PNAS)** 98(1) :271-276.
- Saxena S, Pant N, Jain DC, Bhakuni RS, 2003. Antimalarial agents from plant sources. **Curr Sci** 84 (9) : 1314—1329.
- Schlesinger PH, Krogstad DJ, Herwald BL , 1988. Antimalarial agents: mechanisms of action. **J Antimicrob Agents Chemother** 793-798.
- Schwikkard S, van Heerden F, 2002. Antimalarial activity of plant metabolites. **Nat Prod Report** 675-692.
- Senczuk AM, Reeder JC, Kosmala MM, Ho M, 2001. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 function as a ligand for P-selection. **Blood** 98 (10) : 3132-3135.
- Sherman IW, 1998. **Malaria, Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection**, , Washington, D.C : ASM press.
- Shenai BR, Lee BJ, Hernandez AA, Chong PY, Emal CD, Neitz RJ, Roush WR and Rosenthal PJ, 2003. Structure activity relationships for inhibition of cysteine protease activity and development of *Plasmodium falciparum* by peptidyl vinyl sulfones. **Antimicrob Agents Chemother** 47 (1) : 154- 160.
- Shenai BR, Sijwali PS, Singh A, Rosenthal PJ, 2000. Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. **J Biol Chem** 275, 29000-29010.
- Sijwali PS, Kato K, Seydel KB, Gut J, Klemba M, Goldberg DE, Miller LH, Rosenthal PJ, 2004. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasite. **Proc Natl Acad sci (PNAS)** 101(23) :8721-8726.
- Sijwali PS, Rosenthal PJ, 2004 ^a. Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad sci (PNAS)** 101(13) : 4384-4389.

- Sijwali PS, Shenai BR, Gut J, Singh A, Rosenthal PJ, 2001. Expression and characterization of *Plasmodium falciparum* haemoglobinase falcipain-3. **Biochemistry** 360: 481-489.
- Silverstein RM, Webster FX, 1998. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. John Wiley and Sons Inc, pp 87.
- Silfen J, Yanai P, Cabantchik ZI, 1988. Bioflavonoids effects on in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. Inhibition of permeation pathways induced in the host cell membrane by the intraerythrocytic parasite. **Biochem Pharmacol** 37: 4269-4267.
- Simanjuntak P, 1995. Tumbuhan sebagai Sumber Zat Aktif Antimalaria. **Bul Pen Kes**, hlm. 6-11.
- Singh N, Sijwali PS, Pandey KC, Rosenthal PJ, 2006. *Plasmodium falciparum* : biochemical characterization of cysteine protease falcipain-2. **Sci direct exp parasitol** 112 : 187-192.
- Siswandono, Soekardjo B, 1998. **Prinsip-prinsip rancangan obat**. Surabaya: Airlangga University Press, hlm.10-108
- Syafruddin D, Siregar JE, Asih PBS, 2004. Antimalarial drug resistance in Indonesia : a molecular analysis. Symposium of malaria Control in Indonesia, **Proceeding**. TDC Airlangga University, Surabaya.
- Skoog A, 1981. **Principle of instrumental analysis**. Japan: Holt Sounder International, pp. 407-447, 523-565, 837-847.
- Stahl E, 1985. **Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi** (Terjemahan Kosasih P dan Iwang S), Bandung : Institut Teknologi Bandung, hlm 68-78
- Stead AM, PH Schlesinger, DJ Krogstad, BL Herwaldt, 2001. Diamidine compounds: selective uptake and targeting in *Plasmodium falciparum*. **Mol Pharmacol** 59 : 1298-1306.
- Steele JCP, Phelps RJ, Simmonds MSJ, 2002. Two novel assays for the detection of haemin-binding properties of antimalarials evaluated with compounds isolated from medicinal plants. **J Antimicrob Chemother** 50,25-31.
- Strickland GT 1991. **Malaria**. In : **Hunter's tropical medicine**, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, pp 586-617.

- Stryer L, 1988. **Biochemistry**, 3th ed. WH Freeman and company, New york. pp 145-172.
- Sub Direktorat Malaria, 2004. **Kejadian Luar Biasa (KLB) malaria di Indonesia 1991-2003**. Direktorat Jenderal Pencegahan Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan Pemukiman. Jakarta.
- Sullivan Jr, Dj, 2001. **Hemozoin: biocrystal synthesized during the degradation of hemoglobin**. Reviuew, Departemen of molecular microbiology and immunology, Bloomebg Scholl of Public Health, John Hopkins University, pp 129-136.
- Sutisna P, 2004. **Malaria secara ringkas : dari pengetahuan dasar sampai terapan**, Ed 1, Jakarta : Kedokteran EGC.
- Syah YM, Ahmad SA, Ghisalberti EL, Hakim EH, Makmur L, Mujahidin D, 2002. Artoindonesianin Q-T, four isoprenylated Flavones from *Artocarpus champeden* Spreng. (Moraceae). **J Phyto chem** 61 : 949-953.
- Syah YM, Ahmad SA, Ghisalberti EL, Hakim EH, Makmur L, Mujahidin D, 2004. Two new cytotoxic isoprenylated flavones, artoindosianin U and V from the heartwood of *Artocarpus champeden*. **J Fitoter** 75 (2) : 134-140.
- Syah YM, Juliawaty LD, Achmad SA, Hakim EH, Ghisalberti EL, 2006. Cytotoxic prenylated flavones from *Artocarpus champeden*. **J Nat Med** 60: 308—312 .
- Taramelli D, Monti D, Omodeo-Salè F, Basilico N, Parapini S, Pasini E, Lombardi L, Olliaro LO, 2001. Ultrastructural characteristics, biological activity and pharmacological relevance of synthetic malaria pigment (beta-haematin). **Parasitol** 43 (1):45-9.
- Tekwani BL, Walker LA, 2005. Targeting the hemozoin synthesis pathway for the new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro β -hematin formation assay. **Combinatorial hight Throughput Screening**, 8:63-70.
- Tjitra E, 1993. Studi perbandingan pengobatan halofantrin antara penderita malaria falciparum tanpa komplikasi pada uji *in vivo* sensitif dengan yang resisten klorokuin. **Bul Penel Kes** 21(1):123.
- Tjitra E, 2004. Pengobatan malaria dengan kombinasi Artemisinin, **Proceeding**, Symposium of malaria control in Indonesia, November 29-30, 2004. Kerjasama TDC Universitas Airlangga dan JICA. P 63-72.

- Trager W, Jensen JB, 1976. Human malaria parasites in continuous culture, **Sci** 193: 673-675.
- Tripathi AK, Gupta A, Garg SK, Tekwani BL, In Vitro β -hematin formation assay with plasma of mice infected with *Plasmodium yoelii* and other parasite preparations comparative inhibition with quinoline and endoperoxide antimalarials, 2001. **Life Sci** 69 : 2725-2733.
- Utomo NDW, 2003. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Methanol Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.) terhadap *Plasmodium berghei* in-vivo. **Skripsi**, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya
- Van Steenis CGGJ, 1978. **Flora untuk Sekolah di Indonesia**, Jakarta : Pradnya Paramita, him 406-407.
- Vennerstrom J, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu CK, Chollet J, Dong Y, Dorn A, Hunziker D, Matile H, McIntosh K, Padmanilayam M, Thomas JS, Scheurer C, Scorneaux B, Tang Y, Urwyler H, Wittlin S, Charman W, 2004. Identification antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate, **Nature** 430 : 900-904.
- Vickery ML, Vickery B, 1981. **Secondary Plant Metabolism**, 1st Ed. Baltimore: University Park Press, pp183-186.
- Voet D, Voet JG, 1995. **Biochemistry**, second Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 215-407.
- Warhust DC, Craig JC, Adagu IS, Meyer DJ and Lee SY, 2003. The Relationship of Physico-chemical properties and Structure to the Differential Antiplasmodial Activity of Cinchona Alkaloids. **Malaria J** 2 (26) : 1-14.
- Weatherall PJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, 2002. Malaria and The Red Cell. **Amer Soc Hematol**.
- Weenen H, Nkunya MHH, Bray DH, Mwasumbi LB, Kinabo LS, Kilimali VAEB, 1990. Antimalarial Compounds Containing an α,β -Unsaturated carbonyl Moiety from Tanzanian Medicinal Plants. **Planta Med** 56 : 371-373.
- Wei BL, Weng JR, Chiu PH, Hung CF, Wang JP, Lin CN, 2005. Antiinflammatory flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*. **J Agric Food Chem** 53: 3867-3871.

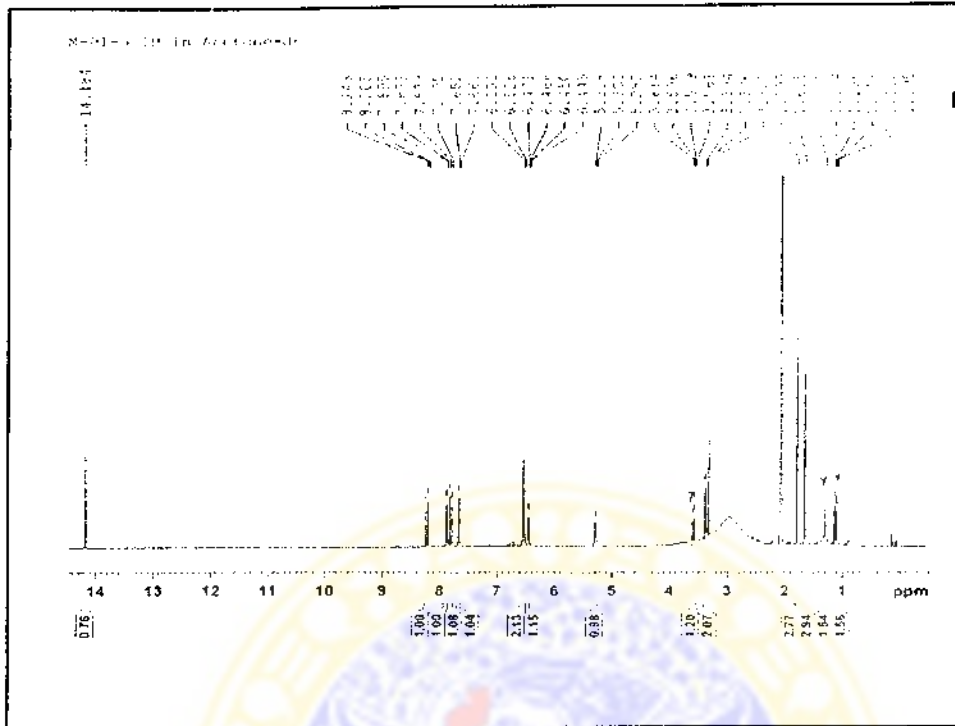
- Wickham ME, Culvenor JG and Cowman AF, 2003. Selective inhibition of a two step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. **J Biol Chem** 278 (39): 37658-37663.
- Widyawaruyanti A, Subehan, kalauni SK, Awale S, Nindatu M, Zaini NC, Sjafruddin D, Asih PBS, Tezuka Y, Kadota S, 2007. New prenylated flavones from *Artocarpus champeden* and their antimalarial activity in vitro, **Nat Med J** 61(4): 410- 413.
- Widyawaruyanti, 2007^a. Potensi dan mekanisme antimalaria senyawa flavonoid hasil isolasi dari kulit batang *Artocarpus champeden* Spreng. **Disertasi**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, 2007.
- Wickham ME, Rug M, Ralph SA, Klonis N, McFadden GI, Tilley L, Cowman AF, 2002. Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes, **EMBO J** 20 (20): 5636-5649.
- Wiser MF, 2001. Biochemistry of Plasmodium. Reviuw, Tulane University, http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref_msp (Juni 2005).
- Wiser MF, 2004. Cellular and molecular biology of *Plasmodium*. Reviuw, Tulane University, http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html#ref_msp, (2 Desember 2005).
- Wiser, 2003. Mechanism of drug action and resistance (Focus on malarials) <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/summary.html#na> (2 Desember 2005).
- World Health Organization, 19 Mei 2003. **WHO report meeting on Antimalarial drug development**. Manila. <http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai>.
- Wright CW, 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. **J Etnopharmacol** 100 :67-71.
- Zaini NC, Dachlan YP, Syafrudin, 2005. Potensi dan Mekanisme Aksi Senyawa Aktif Antimalaria Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng.), **Laporan Penelitian HPTP**, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Zarchin S, Krugliak M, Ginsburg H, 1986. Digestion of the host erythrocyte by malaria parasites is the primary target for quinoline-containing antimalarials. **Biochem Pharmacol** 35: 2435-2442.

LAMPIRAN 1

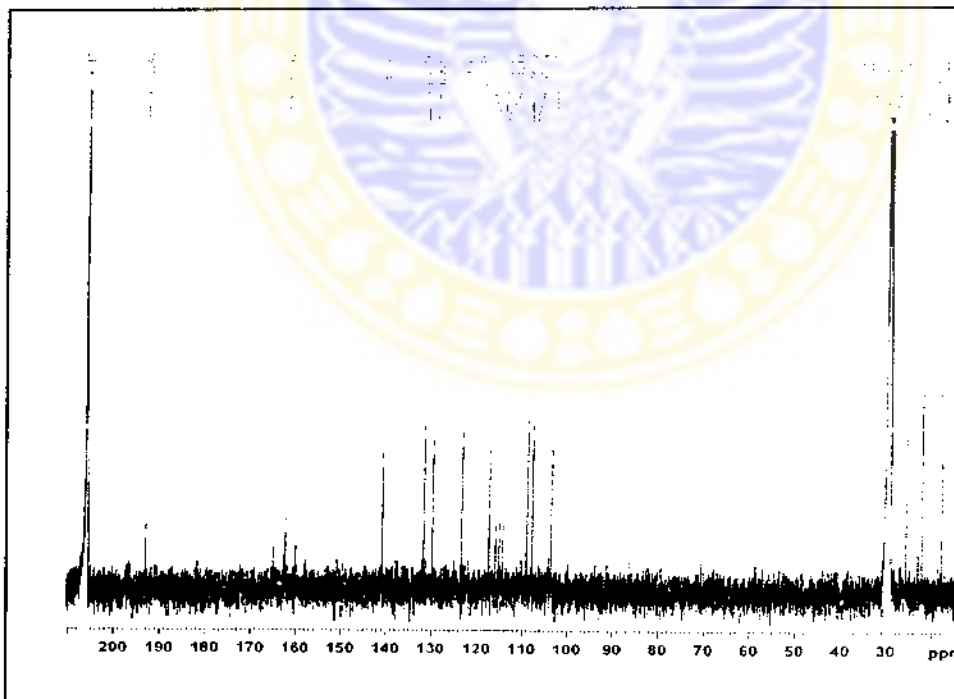
IDENTIFIKASI DAN SPEKTRA RMI SENYAWA ME1 EKSTRAK METANOL
ARTOCARPUS CHAMPEDEN SPRENG

1. Interpretasi hasil identifikasi senyawa ME1 menggunakan KLT dengan penampak noda .

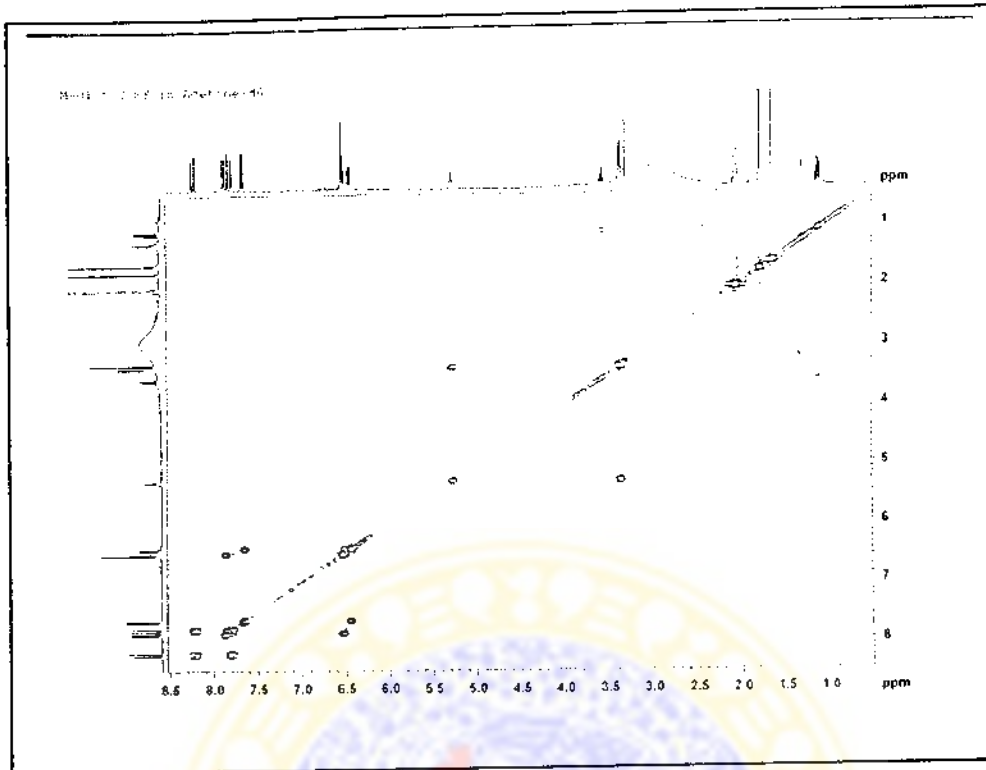
senyawa	Cara Identifikasi	Hasil Pengamatan	Dugaan
Senyawa ME1	Sinar tampak	Merah coklat, tidak stabil/cepat pudar	Pigmen warna/antosianin, flavonoid, flavonoid-glikosida (Harborne, 1987)
	UV 254 nm	Coklat tua/gelap (meredam sinar UV)	Flavonoid, kumarin, terpenoid (Wagner, 1984)
	UV 365 nm	Coklat, pudar	Flavonoid, kumarin, (Wagner, 1984)
	Serisulfat	orange	Flavonoid
	Anisaldehid-asam sulfat	Tidak berwarna	Bukan terpenoid (Wagner, 1984)



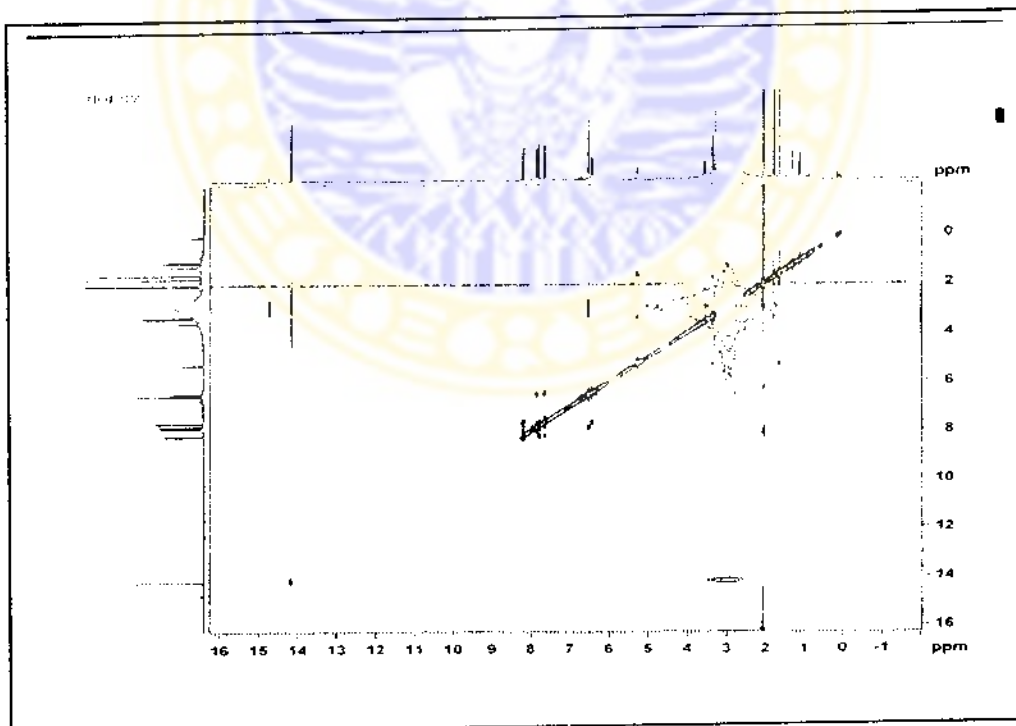
2. Spektrum RMI-¹H senyawa morakhalkon A dalam Aseton-d6



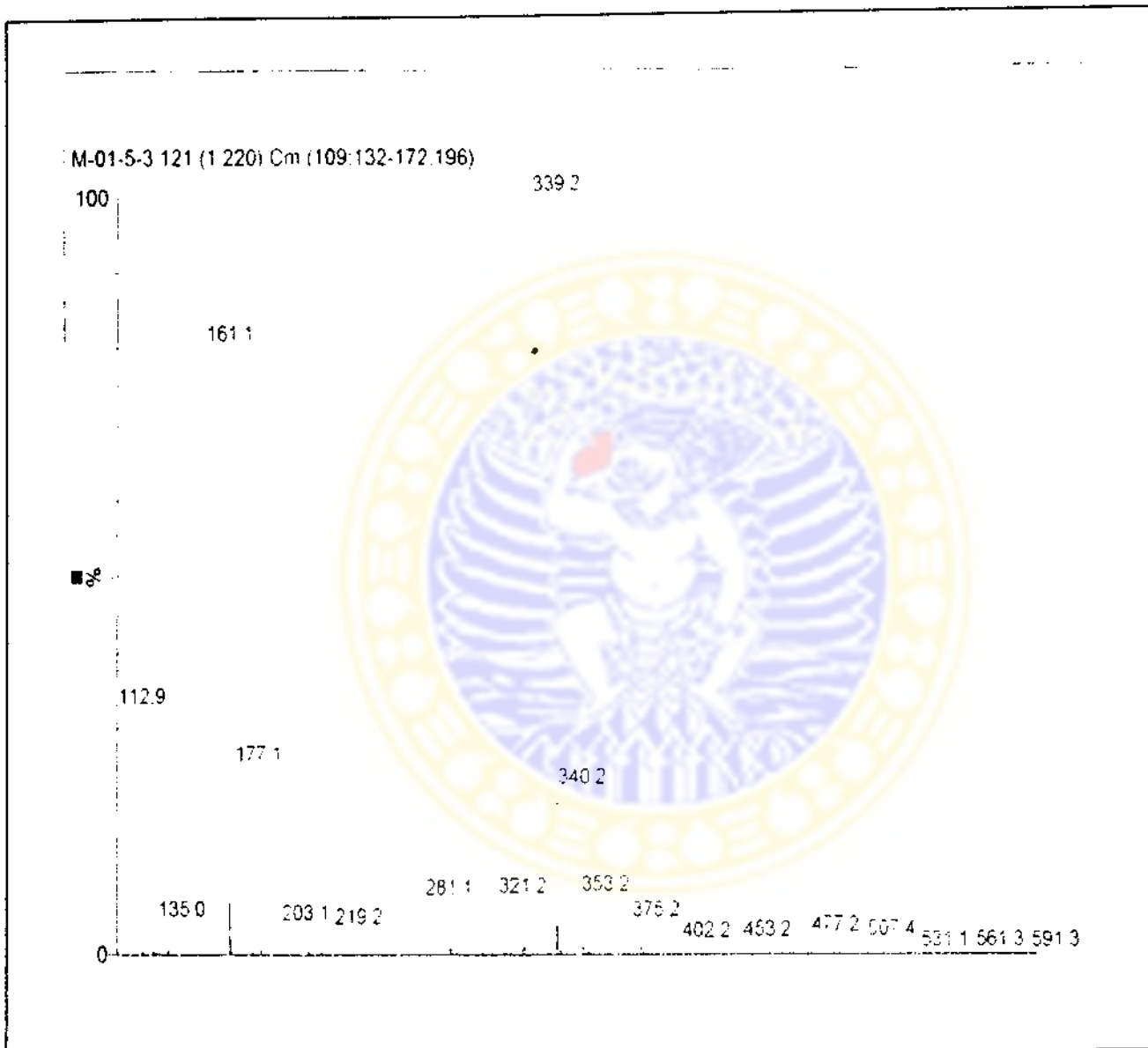
3. Spektrum RMI-¹²C senyawa morakhalkon A dalam aseton -d6



4. Spektrum RMI-COSY senyawa morakhalkon A dalam aseton -d₆



5. Spektrum RMI-NOESY senyawa morakhalkon A dalam aseton -d₆



7. Spektrum Massa senyawa morakhaikon A

LAMPIRAN 2
PERSEN PERTUMBUHAN DAN HAMBATAN *PLASMODIUM FALCIPARUM*
(STRAIN 3D7) OLEH ISOLAT DAN SENYAWA *ARTOCARPUS CHAMPEDEN*
SPRENG *IN VITRO*

No.	Isolat/ Senyawa	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata % Parasitemia		% Pertumbuhan	% Hambatan
			0 jam	48 jam		
	Fraksi ME II	K (-)	0,86	5,93	100,00	0,00
		100		0,18	0,00	100,00
		10		2,62	34,71	65,29
		1		2,66	35,50	64,50
		0,1		3,27	47,54	52,46
		0,001		4,72	76,13	23,87
1.	Morakalkhon A	K (-)	0,97	6,38		
		10		0,55	0,00	100,00
		1		3,72	52,92	52,93
		0,1		4,81	57,06	42,94
		0,001		6,84	100,00	15,50
		0,0001		7,17	100,00	13,00
2	Isolat ME2	K (-)	0,97	6,38		
		10		2,40	25,85	74,15
		1		3,91	49,23	50,77
		0,1		4,44	57,43	42,57
		0,001		4,43	45,98	54,02
		0,0001		8,15	100	0,00
3	Artoindonesianin R	K (-)	0,65	6,38	-	-
		10		1,91	21,98	78,01
		1		3,46	49,04	50,96
		0,1		4,33	64,22	35,78
		0,001		5,33	81,68	18,32
		0,0001		5,87	91,10	8,90
4	Artoindonesianin A-2	K (-)	1,74	6,58		
		10		1,75	17,29	82,71
		1		4,04	56,50	43,49
		0,1		4,18	58,90	41,10
		0,001		5,57	82,71	17,29
5	Sikloheterofilin	K (-)	0,59	6,09	-	-
		10		0,60	0,18	99,82
		1		1,37	0,14	85,82
		0,1		2,08	27,09	72,91
		0,01		3,64	55,45	44,55
		0,001		3,89	60,00	40,00

LAMPIRAN 3

HASIL ANALISIS PROBIT
SENYAWA FLAVONOID DARI ARTOCARPUS CHAMPEDEN SPRENG

1. Hasil Analisis Probit Morakhalkon A (Ulangan1)

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 13 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.94522	.06812	13.87682
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.65349	.09207	7.09754

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 21.233, DF = 3 P = .000

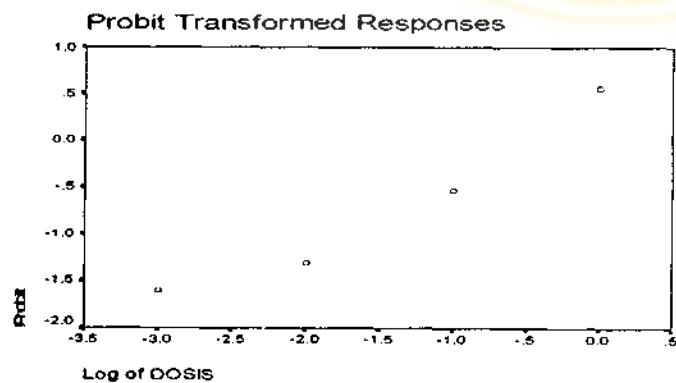
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
1.00	100.0	100.0	94.506	5.494	.94506
.00	100.0	71.2	74.328	-3.088	.74328
-1.00	100.0	29.6	38.525	-8.965	.38525
-2.00	100.0	9.5	10.805	-1.275	.10805
-3.00	100.0	5.5	1.455	4.035	.01455

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00070	.00000	.00764
.02	.00137	.00000	.01206
.03	.00208	.00000	.01622
.04	.00286	.00000	.02034
.05	.00370	.00001	.02454
.06	.00461	.00001	.02887
.07	.00559	.00002	.03336
.08	.00664	.00003	.03805
.09	.00777	.00004	.04296
.10	.00897	.00006	.04813
.15	.01630	.00023	.07880
.20	.02620	.00069	.12079
.25	.03936	.00169	.18062
.30	.05673	.00363	.26936
.35	.07961	.00707	.40656
.40	.10980	.01275	.62799
.45	.14986	.02154	1.00145
.50	.20353	.03445	1.66016
.55	.27643	.05271	2.87763
.60	.37728	.07788	5.24601
.65	.52034	.11228	10.13466
.70	.73017	.15955	20.98811
.75	1.05248	.22606	47.48304
.80	1.58136	.32384	121.27180
.85	2.54176	.47888	371.96330
.90	4.61805	.76041	1569.85596
.91	5.33449	.84710	2231.11834
.92	6.23932	.95124	3273.04763
.93	7.41233	1.07901	4995.55492
.94	8.98493	1.24008	8023.70135
.95	11.18962	1.45064	13800.22053
.96	14.48043	1.74027	26154.35000
.97	19.88059	2.17060	57559.46510
.98	30.29759	2.89997	164915.62713
.99	58.85799	4.54438	872958.03116



2. Hasil Analisis Probit Morakhalikon A (Ulangan 2).

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 0 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 14 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	1.12778	.08880	12.70055
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.49599	.09117	5.44014

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 21.654 DF = 3 P = .000

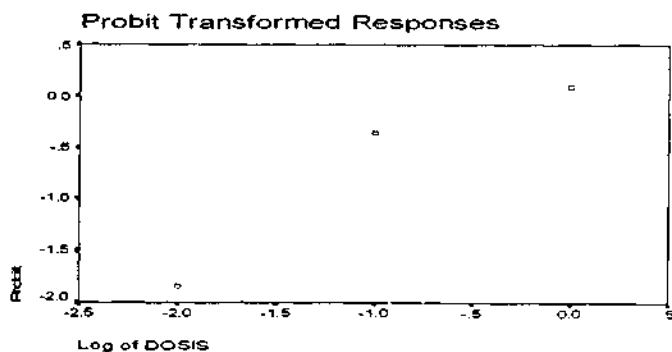
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
1.00	100.0	100.0	94.779	5.221	.94779
.00	100.0	53.7	69.005	-15.355	.69005
-1.00	100.0	36.0	26.376	9.654	.26376
-2.00	100.0	3.2	3.924	-.694	.03924
-3.00	100.0	.0	.194	-.194	.00194

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00314	.00000	.02700
.02	.00548	.00000	.03915
.03	.00781	.00000	.04984
.04	.01018	.00001	.05997
.05	.01264	.00001	.06992
.06	.01519	.00002	.07986
.07	.01785	.00003	.08991
.08	.02062	.00005	.10017
.09	.02352	.00007	.11069
.10	.02654	.00010	.12156
.15	.04377	.00041	.18283
.20	.06515	.00122	.26132
.25	.09165	.00301	.36742
.30	.12451	.00655	.51822
.35	.16540	.01290	.74361
.40	.21655	.02341	1.09827
.45	.28105	.03957	1.68575
.50	.29325	.06292	2.70983
.55	.46949	.09497	4.58921
.60	.60932	.13740	8.23080
.65	.79775	.19259	15.73343
.70	1.05971	.26438	32.38221
.75	1.43970	.35951	73.04561
.80	2.02520	.49070	186.44140
.85	3.01444	.68461	572.45875
.90	4.97225	1.00926	2421.95684
.91	5.61111	1.10425	3444.40839
.92	6.39850	1.21596	5056.59000
.93	7.39240	1.34991	7723.85260
.94	8.68599	1.51459	12416.71203
.95	10.43982	1.72389	21376.89813
.96	12.95790	2.00266	40559.11689
.97	16.90056	2.40125	89378.16545
.98	24.05806	3.04456	256497.97332
.99	41.97338	4.39446	1360859.37805



2. Hasil Analisis Probit isolat ME II (Ulangan1)

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 0 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 10 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.67390	.05441	12.38578

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.30016	.07569	3.96561

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 14.520 DF = 3 P = .002

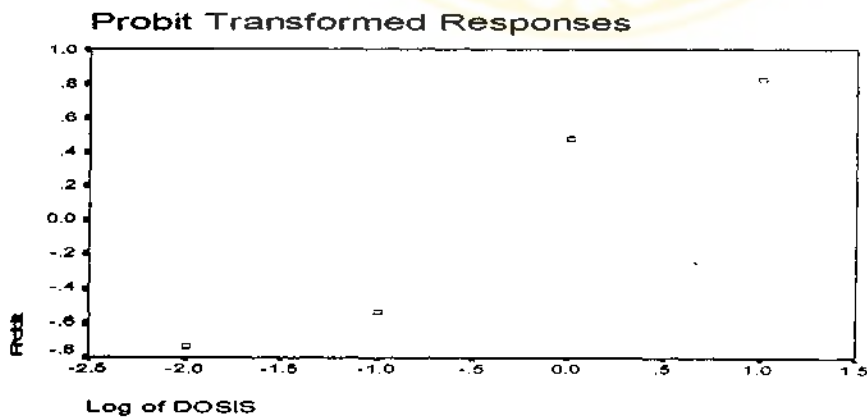
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
1.00	100.0	79.7	83.499	-3.819	.83499
.00	100.0	68.2	61.797	6.433	.61797
-1.00	100.0	29.5	35.430	-5.910	.35430
-2.00	100.0	23.2	14.740	8.490	.14740
-3.00	100.0	.0	4.258	-4.258	.04258

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00013	6.253665E-09	.00245
.02	.00032	.00000	.00463
.03	.00058	.00000	.00696
.04	.00091	.00000	.00950
.05	.00130	.00000	.01228
.06	.00177	.00000	.01531
.07	.00232	.00000	.01863
.08	.00295	.00001	.02224
.09	.00367	.00001	.02619
.10	.00450	.00002	.03050
.15	.01039	.00011	.05871
.20	.02022	.00045	.10286
.25	.03579	.00141	.17389
.30	.05976	.00379	.29256
.35	.09612	.00891	.50304
.40	.15088	.01883	.89558
.45	.23341	.03633	1.67367
.50	.35858	.06491	3.30899
.55	.55088	.10912	6.95297
.60	.85217	.17543	15.59083
.65	1.33771	.27403	37.56239
.70	2.15152	.42240	98.49491
.75	3.59304	.65284	287.69579
.80	6.36018	1.03122	975.71442
.85	12.37518	1.71245	4156.37716
.90	28.59452	3.15696	26431.92668
.91	35.00540	3.64776	41455.58625
.92	43.60883	4.26290	67673.11023
.93	55.52841	5.05338	116138.60130
.94	72.73068	6.10233	212588.53893
.95	98.94358	7.55508	424300.52011
.96	142.04718	9.69157	957412.78390
.97	221.56415	13.13203	2609850.70885
.98	400.08132	19.60035	9931513.68969
.99	1015.44992	36.62242	82120633.1424



4. Hasil Analisis Probit isolat ME II (Ulangan 2)

DATA Information

5 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 0 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

 Parameter estimates converged after 8 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.46654	.04693	9.94012

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.21364	.07198	2.96811

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 35.076 DF = 3 P = .000

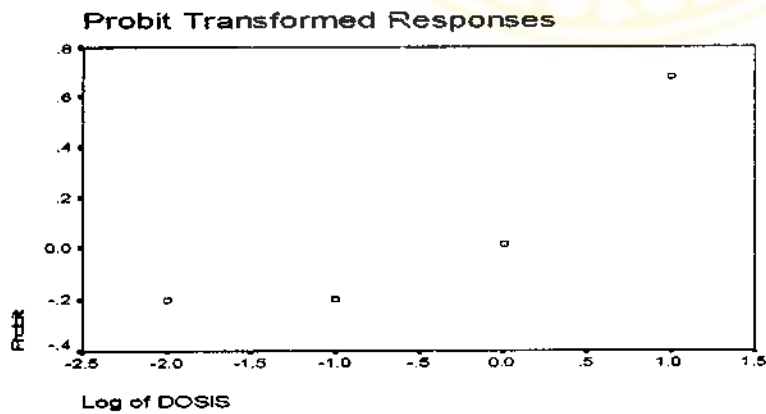
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
1.00	100.0	75.0	75.180	-.180	.75180
.00	100.0	50.7	58.458	-7.808	.58458
-1.00	100.0	42.3	40.017	2.243	.40017
-2.00	100.0	42.1	23.593	18.507	.23593
-3.00	100.0	.0	11.782	-11.782	.11782

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Lower	Limits Upper
.01	.00000	.	.
.02	.00001	.	.
.03	.00003	.	.
.04	.00006	.	.
.05	.00010	.	.
.06	.00016	.	.
.07	.00024	.	.
.08	.00034	.	.
.09	.00047	.	.
.10	.00062	.	.
.15	.00209	.	.
.20	.00547	.	.
.25	.01248	.	.
.30	.02619	.	.
.35	.05202	.	.
.40	.09978	.	.
.45	.18738	.	.
.50	.34840	.	.
.55	.64779	.	.
.60	1.21652	.	.
.65	2.33344	.	.
.70	4.63562	.	.
.75	9.72335	.	.
.80	22.18469	.	.
.85	58.02605	.	.
.90	194.54537	.	.
.91	260.56760	.	.
.92	357.91467	.	.
.93	507.41460	.	.
.94	749.30380	.	.
.95	1168.79877	.	.
.96	1970.54348	.	.
.97	3745.11087	.	.
.98	8793.97584	.	.
.99	33766.55860	.	.



**5. Ringkasan Hasil Analisis Probit isolat dan senyawa flavonoid
*A. champeden***

Isolat/senyawa	Koefisien regresi	Standart eror	P
FME II	0,83599	0,6390	0,000
Morakhaikhon A	0,73010	0,09172	0,000
Isolat ME2	0,55979	0,04988	0,000
Sikloheterofilin*)	0,29074	0,04590	0,090
Artonidonesianin A-2 *)	0,55210	0,04968	0,012
Artonidonesianin R *)	0,51906	0,04822	0,642

**Keterangan : *) Sikloheterofilin, Artonidonesianin A-2 dan R
(Widyawaruyanti et al, 2006)**

LAMPIRAN 4

**PENGUKURAN KADAR PROTEIN PARASIT MALARIA YANG DIBERIKAN
SENYAWA AKTIF *ARTOCARPUS CHAMPEDEN* DENGAN METODE
BRADFORD**

Sampel		Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrol (-)	0 jam	0,174	1,716
Kontrol (-)	6 jam	0,203	2,002
Morakhalkon A	0 jam	0,159	1,569
Morakhalkon A	6 jam	0,064	0,631
Isolat ME 2	0 jam	0,204	2,012
Sikloheterofilin	0 jam	0,225	1,940
Sikloheterofilin	6 jam	0,294	2,535
Artoindonesianin A-2	0 jam	0,067	0,661
Artoindonesianin A-2	6 jam	0,108	1,065
Artoindonesianin R	0 jam	0,150	1,479
Artoindonesianin R	6 jam	0,070	0,691
W6		0,034	0,335

Sampel yang memiliki kadar paling kecil, dijadikan patokan dalam penentuan volume sampel yang akan dimasukkan. Kadar protein sampel yang dimasukkan adalah $0,335 \times 15 \mu\text{l} = 5,025 \mu\text{g}$. Kapasitas masing-masing sumur SDS-PAGE adalah $20 \mu\text{l}$, yang mengandung sampel protein parasit $15 \mu\text{l}$ dan sampel buffer SDS-PAGE, sebagai berikut :

Sampel		Volume sampel (µl)	PBS yang ditambahkan (µl)	Sampel buffer (µl)
Kontrol (-)	0 jam	2,93	12,07	5
Kontrol (-)	6 jam	3,54	12,49	5
Morkhalkon A	0 jam	3,20	11,80	5
Morkhalkon A	6 jam	7,96	7,04	5
Isolat ME 2	0 jam	2,50	12,50	5
Sikloheterofilin	0 jam	4,13	10,87	5
Sikloheterofilin	6 jam	3,16	11,84	5
Artoindonesianin A-2	0 jam	7,60	7,40	5
Artoindonesianin A-2	6 jam	4,72	10,28	5
Artoindonesianin R	0 jam	3,40	11,60	5
Artoindonesianin R	6 jam	7,27	7,73	5

LAMPIRAN 5

**PERSEN HAMBATAN PEMBENTUKAN β -HEMATIN OLEH SENYAWA
AKTIF ANTIMALARIA *ARTOCARPUS CHAMPEDEN* DAN DATA UJI ANAVA**

No.	Isolat/senyawa	Absorban (414nm)	% pembentukan β -Hematin	% Hambatan β -hematin	% Hambatan β -hematin
1.	Sikloheterofin	0,48	62,34	37,66	33,42 \pm 6,00
		0,51	70,83	29,17	
2.	Artoindonsianin A-2	0,72	93,51	6,49	8,10 \pm 2,28
		0,65	90,28	9,72	
3.	Artoindonesianin R	0,51	66,23	33,77	28,69 \pm 7,18
		0,55	76,39	23,61	
4.	Mokhalkon A (ME1)	0,29	37,66	62,34	61,05 \pm 1,82
		0,31	40,26	59,76	
5.	Isolat ME2	0,27	35,06	64,94	61,11 \pm 0,24
		0,25	34,72	65,28	
6.	K + (CQ)	0,20	25,97	74,03	71,74 \pm 3,25
		0,22	30,56	69,44	
7.	K-	0,77	100,0	0,00	0,00 \pm 0,00
		0,72	100,0	0,00	