

PLANTS MEDICINE  
**TESIS**

**AKTIVITAS ANTIMALARIA ISOLAT YANG BERASAL DARI  
EKSTRAK DIKLOROMETANA KULIT BATANG  
ARTOCARPUS CHAMPEDEN SPRENG. SECARA IN VITRO**

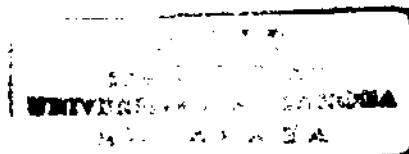
TF 02/06

Nur  
a



**NURI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**



# **TESIS**

## **AKTIVITAS ANTIMALARIA ISOLAT YANG BERASAL DARI EKSTRAK DIKLOROMETANA KULIT BATANG *ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG. SECARA *IN VITRO***

**N U R I  
NIM. 090315014**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**

ii

**AKTIVITAS ANTIMALARIA ISOLAT YANG BERASAL DARI  
EKSTRAK DIKLOROMETANA KULIT BATANG  
*ARTOCARPUS CHAMPEDEN* SPRENG. SECARA *IN VITRO***

**T E S I S**

**Untuk Memperoleh Gelar Magister  
Dalam program Studi Ilmu Farmasi  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**N U R I  
NIM. 090315014**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**

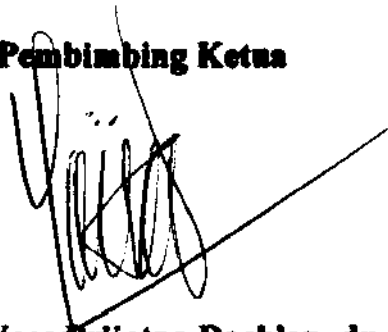
**iii**

**Lembar pengesahan**

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 12 APRIL 2006**

**Oleh :**

**Pembimbing Ketua**



**Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc.**  
**NIP. 130 395 278**

**Pembimbing**



**Dr. rer. nat. Mulja Hadi Santosa, Apt.**  
**NIP. 130 809 084**

**Mengetahui**

**Ketua Program Studi Ilmu Farmasi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.**  
**NIP. 131 563 457**

Telah diuji pada  
Tanggal 28 Februari 2006

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua** : Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, Apt.

**Anggota** : 1. Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr. M.Sc.

2. Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt.

3. Dra Aty Widyawaruyanti, Apt., M.Si.

4. Dra. Heny Arwati, M.Sc., PhD.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga saya ucapkan kepada Pembimbing Ketua Prof. Dr. dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc. dan Pembimbing Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt. atas segala bimbingan, dorongan dan saran yang tidak terkira nilainya. Semoga Allah Yang Maha Pengasih membalas dengan limpahan rahmatNya.

Terima kasih yang tulus juga saya sampaikan kepada para guru yang telah mendidik, membina dan memberikan ilmunya kepada saya terutama selama menempuh Program Magister di Universitas Airlangga.

Saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, Apt. selaku ketua tim Peneliti Hibah Pasca yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk terlibat dalam penelitian Hibah Pasca.

Rasa syukur dan terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada orang tua, bapak dan ibu mertua, isteri dan anak-anak saya, bulik dan seluruh keluarga atas dukungan moril dan pengertiannya selama saya menempuh pendidikan Magister semoga Allah Yang Maha Pengasih membalas dengan limpahan rahmatNya.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Farmasi, atas bantuan yang diberikan selama mengikuti pendidikan Program Magister.

Kepala Bagian Ilmu Bahan Alam yang telah menyediakan sarana dan fasilitas selama penyelesaian tesis ini.

Kepala Laboratorium Fitokimia dan seluruh staf atas bantuan sarana penelitian dan fasilitas laboratorium selama saya menyelesaikan tesis.

Kepala Tropical Disease Centre (TDC) atas bantuan sarana penelitian dan fasilitas laboratorium selama saya menyelesaikan tesis.

Kepala Laboratorium Dasar Bersama (LDB) atas bantuan pemakaian alat spektrometri resonansi magnetik inti.

Kepala Laboratorium Multipurpose I beserta staf atas bantuan pemakaian alat spektrometri inframerah dan kromatografi cair kinerja tinggi.

Kepada Drs. Achmad Fuad Hafid, Apt., MS dan Dra. Aty Widyawaruyanti, Apt., M.Si. saya ucapkan terima kasih yang tak terhingga atas bimbingan dan dorongan selama saya menyelesaikan tesis.

Rekan-rekan tim peneliti, Arief, Maximus, Bu Maria atas kerja samanya selama penelitian.

Akhirnya kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, saya mengucapkan terima kasih atas bantuan yang saya terima, semoga mendapat balasan dari Allah Yang Maha Pengasih.

Surabaya, Februari 2006

Penulis



## SUMMARY

### **The Antimalarial Activity of Dichlorometane Extract of *Artocarpus champeden* Spreng. Stem Bark Isolate *In Vitro***

In the recent time, the medicinal plants have been as source of lead compounds to treat any diseases, especially infectious diseases. One of infection diseases which often occurred in the tropical countries is malarial disease. The research for medicinal plants to obtain the new compounds which posses antimalarial activity has been done intensively by some reseacher in the recent decade.

In Indonesia, one of plants which has been used traditionally to treat malaria was *Artocarpus champeden* Spreng. The early test antimalarial activity of dichlorometane extract of *A. champeden* showed that it possessed potency to inhibit the growth of *Plasmodium falciparum*. In this research the isolation of dichlorometane extract of *A. champeden* stem bark has been done, and followed by test of antimalarial activity for each step isolation.

The pulverized of *A. champeden* stem bark (750 grams) was macerated with n-hexane to remove the fat. Residue was air-dried and macerated again with dichlorometane. The extract which was obtained then concentrated and produced 6.6 grams diclorometane extract.

The dichlorometane extract was tested for antimalarial activity *in vitro*. Asynchronized *P. falciparum* 3D7 strain was used in this research. The dichlorometane extract was diluted in 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO). As a negative control was DMSO and as positive control was chloroquine diphosphate.

The inhibition of parasite growth was calculated by counting microscopically parasitized-erythrocytes per 5000 erythrocytes on giemsa stained-thin blood films. The  $IC_{50}$  value was calculated by means of probit analysis.

The isolation was continued by fractionation to 4 grams dichloromethane extract. Fractionation was done by vacuum liquid chromatography with the stationary phase was silica gel and the mobile phase were n-hexane, n-hexane-dichlorometane, dichlorometane, dichlorometane- methanol and methanol respectively with declin concentration gradient 5%. This fractionation produced 15 fractions. The 14<sup>th</sup> fraction (985 grams) which possessed antimalarial potency, futhermore separated by open column chromatography. As the stationary phase was used silica gel and as mobile phase were used n-hexane:ethylasetate with ratio 2:1 to 0:1. This separtion produced 8 sub fractions. The 14.6 sub fraction separated by preparative thin layer chromatogrphy, as the stationary phase was used silica gel RP8 and as the mobile phase was used acetonitril:methanol:water (2:2:1), produced the Isolate I 1,1 grams. This isolate was tested for its antimalarial activity.

The result of antimalarial activity of dichlorometane extract, 14<sup>th</sup> fraction and the Isolate I were found to have  $IC_{50}$  value of  $0.974 \pm 0.181 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.189 \pm 0.016 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.024 \pm 0.011 \mu\text{g/ml}$  respectively.

Futhermore, the Isolate I was identified by chromatography and spectroscopy methods. The result of identification by TLC with some stationary phases and mobile phases, visualitation with ammonia was found one intensive yellow spot. The Isolate I was then analyzed by high performace liquid chromatography method, and showed that it contain one major compound and

that it contain one major compound and 1 - 2 additional compounds under  $\lambda$  365 nm. The UV-Vis spectrum profile of the major peak was found to be identical with the UV-Vis spectrum profile of flavonol. After identification of the compound by TLC and the UV-Vis spectrum profile, could be concluded that the compound was flavonol. This conclusion was confirmed by the infrared spectrum of the Isolate I which showed that there were vibration of O-H and C=O bonding, while by the <sup>1</sup>H NMR spectrum of Isolate I showed there were aril protons ArH

Overall, the conclusion was, that Isolate I contained a major compound of flavonol and active as an antimalarial. It is necessary to conduct a further research to determine the structure of that compound and its mechanism of action.

## ABSTRACT

*Artocarpus champeden* stem bark has been used traditionally to treat malaria. Early testing for dichlorometane extract of *A. champeden* stem bark show that it has a potency to inhibit the growth of *Plasmodium falciparum* by *in vitro* method.

The aim of this research was to obtain an isolat from dichlorometane extract of *A. champeden* stem bark which posseses potency to inhibit the growth of *P. falciparum*.

The test of antimalarial activity for dichlorometane extract, 14<sup>th</sup> fraction and Isolate I showed the IC<sub>50</sub> value of  $0.974 \pm 0.181 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.189 \pm 0.016 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.024 \pm 0.011 \mu\text{g/ml}$  respectively.

The Isolate I identification by chromatography and spectroscopy methods gave conclusion that Isolate I contain the flavonol as major compound.

Key word : *Artocarpus champeden* stem bark, *Plasmodium falciparum*, flavonol, antimalarial activity.

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul dalam .....	ii
Prasyarat gelar.....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan penguji .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Summary.....	ix
Abstract.....	xii
Daftar isi .....	xiii
Daftar gambar .....	xvi
Daftar tabel .....	xviii
Daftar lampiran .....	xix
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum .....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Tinjauan tentang <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. ....	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman .....	6
2.1.2 Nama Daerah .....	6
2.1.3 Deskripsi Tanaman .....	7
2.1.4 Kandungan Kimia .....	8
2.1.5 Kegunaan Tanaman .....	9
2.1.6 Penelitian yang Telah Dilakukan terhadap <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. ....	10
2.2 Tinjauan tentang Antimalaria dari Bahan Alam .....	11
2.3 Tinjauan tentang Ekstraksi dan Pemisahan .....	13

	Halaman
2.3.1 Kromatografi Lapisan Tipis .....	14
2.3.2 Kromatografi Kolom .....	15
2.3.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	15
2.4. Tinjauan tentang Spektrometri .....	16
2.4.1 Spektrometri UV-Vis .....	16
2.4.2 Spektrometri Inframerah .....	17
2.4.3 Spektrometri Resonansi Magnetik Inti .....	17
2.5 Tinjauan tentang Malaria .....	19
2.5.1 Penyakit Malaria .....	19
2.5.2 Tinjauan tentang <i>P. falciparum</i> .....	19
2.5.2.1 Morfologi <i>P. falciparum</i> .....	19
2.5.2.2 Siklus Hidup <i>P. falciparum</i> .....	20
2.6 Tinjauan tentang Uji Antimalaria <i>In Vitro</i> .....	22
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...</b>	<b>24</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	24
3.2 Hipotesis Penelitian .....	27
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
4.1 Rancangan Penelitian .....	28
4.2 Bahan Penelitian .....	28
4.3 Alat Penelitian .....	29
4.4 Prosedur Penelitian.....	29
4.4.1 Penyiapan bahan .....	29
4.4.1.1 Pembuatan Ekstrak Diklorometana .....	29
4.4.1.2 Fraksinasi Ekstrak Diklorometana dengan Kromatografi Kolom Vakum .....	29
4.4.1.3 Isolasi Fraksi Diklorometana dengan Kromatografi Kolom Lambat .....	31
4.4.2 Analisis Ekstrak, Fraksi dan Isolat Kulit Batang <i>A. champeden</i> dengan KCKT .....	31
4.4.3 Identifikasi Isolat .....	32
4.4.3.1 Identifikasi dengan Spektroskopi UV-Vis .....	32

	Halaman
4.4.3.2 Identifikasi dengan Spektroskopi Inframerah .....	32
4.4.3.3 Identifikasi dengan Spektroskopi RMI .....	32
4.4.4 Prosedur Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vitro</i> .....	32
4.4.4.1 Persiapan Medium .....	32
4.4.4.2 Persiapan Eritrosit 50% .....	33
4.4.4.3 Prosedur Biakan .....	34
4.4.4.4 Sub Biakan .....	35
4.4.4.5 Uji Aktivitas <i>In Vitro</i> .....	35
4.4.5 Evaluasi Hasil Uji Efek Antimalaria .....	36
4.4.6 Analisis Data .....	37
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>40</b>
5.1 Hasil Ekstraksi dan Isolasi Kulit Batang <i>A. champeden</i> .....	40
5.2 Hasil Analisis dan Identifikasi secara Kromatografi dan Spektroskopi .....	41
5.2.1 Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis .....	41
5.2.2 Analisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....	43
5.2.3 Identifikasi Isolat .....	44
5.2.3.1 Identifikasi dengan KLT .....	44
5.2.3.2 Identifikasi dengan UV-Vis .....	45
5.2.3.2.1 Identifikasi puncak-puncak pada kromatogram KCKT .....	45
5.2.3.2.2 Identifikasi dengan spektrometer UV-Vis .....	47
5.2.3.3 Identifikasi dengan Spektrometri Resonansi Magnetik Inti Proton .....	47
5.2.3.4 Identifikasi dengan Spektrometri Inframerah .....	48
5.3 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria .....	49
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>53</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>65</b>
7.1 Kesimpulan .....	65
7.2 Saran .....	65
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>66</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>70</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman dan buah <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. ....	8
Gambar 2.2 Kulit batang <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. ....	8
Gambar 2.3 Siklus hidup <i>Plasmodium falciparum</i> .....	22
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual .....	26
Gambar 4.1 Skema metode penelitian .....	38
Gambar 4.2 Skema uji aktivitas antimalaria secara <i>in vitro</i> .....	39
Gambar 5.1 Kromatogram fraksi 1 – 15 ekstrak diklorometana kulit batang <i>A. champeden</i> yang dilarutkan diklorometana, menggunakan fase diam silika gel GF <sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana : etilasetat (3 : 1) dan penampak noda uap amonia .....	40
Gambar 5.2 Kromatogram ekstrak, fraksi 14 dan isolat kulit batang <i>A. champeden</i> yang dilarutkan diklorometana, menggunakan fase diam silika gel RP-18, fase gerak asetonitril : metanol : air (2 : 2 : 1) dengan penampak noda CeSO <sub>4</sub> 1% dalam Asam Sulfat 10% .....	42
Gambar 5.3 Profil kromatogram KCKT ekstrak diklorometana kulit batang <i>A. Champeden</i> yang dilarutkan asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dengan konsentrasi 500 ppm, menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dieluasi selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada $\lambda$ 365 .....	43
Gambar 5.4 Profil kromatogram KCKT fraksi 14 kulit batang <i>A. Champeden</i> yang dilarutkan asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dengan konsentrasi 500 ppm menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dieluasi selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada $\lambda$ 365 ...	44
Gambar 5.5 Profil kromatogram KCKT isolat I kulit batang <i>A. Champeden</i> yang dilarutkan asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dengan konsentrasi 500 ppm menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dieluasi	



selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada  $\lambda$  365 ... 44

- Gambar 5.6 Kromatogram isolat kulit batang *A. Champeden* yang dilarutkan diklorometana (A) fase diam silika gel GF<sub>254</sub> fase gerak kloroform:metanol (98:2), (B) fase diam silika gel GF<sub>254</sub> fase gerak n-heksana:etilasetat (1:1), (C) fase diam silika gel RP-8 fase gerak asetonitril:metanol:air (2:2:1) ..... 45
- Gambar 5.7 Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 16 menit, menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dideteksi dengan *Photo Diode Array* .... 46
- Gambar 5.8 Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 13 menit, menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dideteksi dengan *Photo Diode Array* .... 46
- Gambar 5.9 Spektrum UV-Vis isolat I kulit batang *A. Champeden* dilarutkan metanol p.a, menggunakan spektrometer UV-Vis (Perkin Elmer Lambda EZ 201) ..... 47
- Gambar 5.10 Spektrum RMI proton isolat I kulit batang *A. Champeden* dilarutkan dalam CDCl<sub>3</sub> dengan konsentrasi 4 mg isolat dalam 0,5 ml CDCl<sub>3</sub> menggunakan Spektrometer FT-NMR (Hitachi R-1900) yang dioperasikan pada frekuensi 90 MHz ..... 48
- Gambar 5.11 Spektrum inframerah isolat I kulit batang *A. Champeden* yang dibuat pelet dengan KBr, menggunakan spektrometer FT-IR (Perkin Elmer) ..... 48
- Gambar 6.1 Identifikasi spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 16 menit menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) (A) dengan berbagai senyawa flavonoid (B) yang dikutip dari Markham (1985) ..... 57

## DAFTAR TABEL

## Halaman

Tabel 5.1	Hasil KLT ekstrak diklorometana, fraksi 14 dan isolat kulit batang <i>A. champeden</i> yang dilarutkan diklorometana, menggunakan fase diam silika gel RP-18, fase gerak asetonitril : methanol : air (2 : 2 : 1) dengan penampak noda CeSO <sub>4</sub> 1% dalam Asam Sulfat 10% .....	43
Tabel 5.2	Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan <i>P. falciparum</i> oleh ekstrak diklorometana kulit batang <i>A. Champeden</i> dengan dosis 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 µg/ml setelah kultur <i>P. falciparum</i> diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali .....	49
Tabel 5.3	Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan <i>P. falciparum</i> oleh fraksi 14 dengan dosis 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 µg/ml setelah kultur <i>P. falciparum</i> diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali .....	50
Tabel 5.4	Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan <i>P. falciparum</i> oleh isolat I kulit batang <i>A. champeden</i> dengan dosis 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 dan 10 µg/ml setelah kultur <i>P. falciparum</i> diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali .....	51
Tabel 5.5	Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan <i>P. falciparum</i> oleh kloroquin dengan dosis 0,001; 0,01; 0,1; 1 dan 10 µg/ml setelah kultur <i>P. falciparum</i> diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 .....	52

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Tabel jumlah eritrosit yang terinfeksi <i>P. falciparum</i> (strain G2300) setiap 5000 eritrosit dan %hambatan pertumbuhan oleh fraksi 4 – 15 ekstrak diklorometana kulit batang <i>A. champeden</i> , masing-masing dengan dosis 100 µg/ml. Dikutip dari Qurniawati (2005) .....	70
Lampiran 2 Analisis probit ekstrak diklorometana replikasi ke 1 .....	71
Lampiran 3 Analisis probit ekstrak diklorometana replikasi ke 2 .....	73
Lampiran 4 Analisis probit fraksi 14 ekstrak diklorometana replikasi ke 1 ...	75
Lampiran 5 Analisis probit fraksi 14 ekstrak diklorometana replikasi ke 2 ...	77
Lampiran 6 Analisis probit fraksi isolat I replikasi ke 1 .....	79
Lampiran 7 Analisis probit fraksi isolat I replikasi ke 2 .....	81
Lampiran 8 Analisis probit kloroquin difosfat replikasi ke 1 .....	83
Lampiran 9 Analisis probit kloroquin difosfat replikasi ke 2 .....	85
Lampiran 10 Penimbangan dan preparasi bahan uji .....	87
Lampiran 15 Profil spektra UV-Vis beberapa senyawa flavonol (Dikutip dari Marby dkk., 1970) .....	88

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Pemakaian bahan alam untuk mengatasi berbagai penyakit telah lama dilakukan di berbagai belahan dunia. Menurut Phillipson (1991), sekitar 75-80% penduduk dunia tidak mempunyai kemampuan untuk mendapatkan pengobatan klinik guna mengatasi penyakit yang dideritanya. Oleh sebab itu penggunaan bahan alam untuk pengobatan menjadi penting. Masing-masing negara terutama negara-negara yang sedang berkembang memiliki cara pengobatan tradisional sendiri-sendiri yang sebagian besar memanfaatkan tanaman.

Saat ini tanaman obat telah menjadi sumber senyawa penuntun untuk mengobati berbagai penyakit, khususnya penyakit infeksi. Salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi di negara-negara tropis adalah penyakit malaria. Penelitian terhadap bahan alam dalam usaha menemukan senyawa baru antimalaria dilakukan secara intensif oleh beberapa peneliti di dunia pada dasawarsa terakhir ini. Hal ini didasarkan pada beberapa alasan yaitu :

- a. Alkaloid alami kuinin yang telah digunakan sebagai antimalaria sejak sekitar tahun 1630 sampai sekarang masih menunjukkan efektivitasnya dalam melawan *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap klorokuin. Sementara beberapa antimalaria baru hasil sintesis seperti klorokuin, amodiakuin, proguanil, pirimetamin dan sulfadoksin telah dilaporkan terjadi resistensi hanya beberapa tahun setelah pemakaiannya di lapangan.

- b. Penemuan antimalaria baru artemisin dan turunannya dari tanaman *Artemisia annua* yang secara tradisional telah digunakan beratus-ratus tahun di Cina membuktikan bahwa tanaman obat merupakan sumber prototipe antimalaria baru yang potensial untuk terus digali dan diteliti.

Alasan-alasan tersebut di atas telah mendorong eksplorasi dan isolasi tanaman obat yang diduga mengandung senyawa aktif antimalaria. Sampai saat ini telah diketahui beberapa senyawa baru hasil isolasi tanaman obat dari golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid dan xanthon yang memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* dan *in vivo* (Saxena, 2003; Mustofa, 2003).

Di Indonesia, salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria adalah *Artocarpus champeden* Spreng. (cempedak) dari suku Moraceae. Tanaman ini tumbuh terpusat di Asia Tenggara dan banyak ditemukan di Indonesia. Di Irian Jaya, secara empiris kulit batang tanaman ini telah digunakan untuk mengobati penyakit malaria disamping untuk obat disentri dan penyakit kulit (Hakim dkk., 1998).

*Artocarpus* merupakan genus utama dari familia Moraceae (lebih kurang 50 spesies) merupakan genus yang menghasilkan beraneka ragam senyawa fenol yang mengandung substituen isoprenil. Golongan senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol terbesar yang terdapat dalam tumbuhan dan telah diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis dan farmakologis. Penelitian yang telah dilakukan Hakim dkk (1998), menunjukkan bahwa kulit batang cempedak mengandung senyawa utama golongan flavonoid antara lain artokarpin, heteroflavanon-A, senyawa baru siklocampedol bersama dengan empat senyawa triterpen yaitu sikloeukalenol, glutinol, sikloartenon, dan 24-metilensikloartanon, serta suatu sterol,  $\beta$ -sitosterol.

*A. champeden* mengandung suatu campuran flavonoid yang kompleks dan yang menjadi ciri khasnya adalah substituen isoprenil yang terikat pada atom C-3. Struktur molekul yang demikian merupakan ciri khas senyawa-senyawa 3-prenilflavon dan merupakan indikator kemotaksonomi dari suku Moraceae (Achmad, 2004).

Tanaman lain dari suku Moraceae, yaitu *A. integer* dilaporkan oleh Boonlaksiri dkk. (2000) mengandung senyawa stilbene terisoprenilasi (yang kerangka utamanya mirip dengan senyawa flavonoid) memiliki aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P. falciparum* dengan nilai  $IC_{50}$  pada 1.7  $\mu\text{g/ml}$ .

Penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* dan fraksi korofom dari ekstrak metanol menunjukkan adanya aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *P. berghei* (Dhani, 2003; Agriana, 2003). Ekstrak diklorometana juga menunjukkan adanya aktivitas antimalaria baik secara *in vitro* pada kultur eritrosit terinfeksi *P. falciparum* maupun secara *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* (Widyawaruyanti, 2004).

Kohler dkk. (2002) menyebutkan bahwa ekstrak yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50  $\mu\text{g/ml}$  dan fraksi yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari 25  $\mu\text{g/ml}$  dapat dikatakan efektif sebagai antimalaria. Menurut Fidock dkk. isolat yang memiliki  $IC_{50}$  kurang dari 1  $\mu\text{M}$  dapat dilanjutkan uji antimalaria secara *in vivo*. Dari data di atas dapat dilihat bahwa nilai  $IC_{50}$  ekstrak diklorometana jauh di bawah 50  $\mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan hal tersebut diduga kulit batang tanaman *A. champeden* mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas antimalaria dan potensial untuk diisolasi lebih lanjut serta dikembangkan sebagai obat antimalaria.

Untuk mengekstraksi kulit batang *A. champeden* digunakan pelarut diklorometana yang bersifat semipolar. Dengan menggunakan pelarut ini diharapkan

senyawa-senyawa flavonoid dan terpenoid yang bersifat semipolar dapat terekstraksi. Selanjutnya terhadap ekstrak diklorometana dilakukan pemisahan menggunakan cara kromatografi. Pada setiap tahap pemisahan dilakukan uji aktivitas antimalaria, bagian yang aktif dipisahkan lebih lanjut, sehingga pada akhirnya didapatkan senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian tersebut di atas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Apakah isolat yang berasal dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* Spreng. efektif menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat yang berasal dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* Spreng. yang efektif menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan nilai  $IC_{50}$  ekstrak diklorometana, fraksi dan isolat kulit batang *A. champeden* Spreng. terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.
2. Mengidentifikasi isolat yang berasal dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* Spreng.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

- Memberikan sumbangan pengetahuan mengenai daya hambat isolat yang berasal dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* Spreng. terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro* sehingga memperkaya khasanah ilmu pengetahuan dalam bidang bahan alam nabati.
- Mendapatkan isolat dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* Spreng. yang mempunyai aktivitas antimalaria, sehingga dapat dijadikan landasan ilmiah untuk dikembangkan dan diteruskan menjadi obat antimalaria
- Untuk memacu penelitian bahan obat yang berasal dari sumber daya alam nabati beserta pengembangannya terutama yang berkhasiat sebagai antimalaria.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan tentang *Artocarpus champeden* Spreng.

##### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub Kelas	: Monoclamydeae
Bangsa	: Urticales
Suku	: Moraceae
Marga	: <i>Artocarpus</i>
Jenis	: <i>Artocarpus champeden</i> Spreng. (Backer & Van Den Brink, 1965).
Sinonim	: <i>Artocarpus polyphema</i> Pers. (Heyne, 1987)

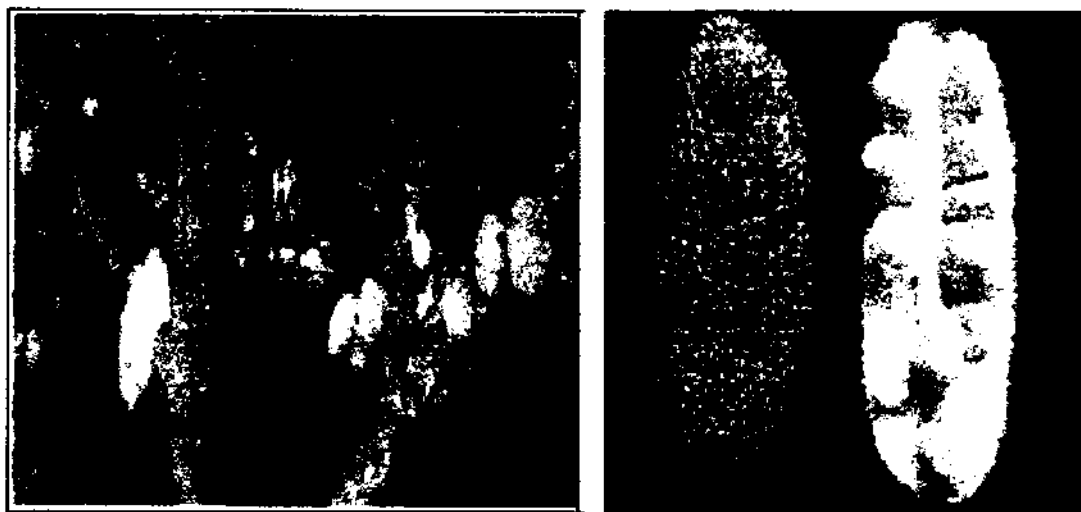
##### 2.1.2 Nama Daerah

Di beberapa daerah, *A. champeden* Spreng. dikenal dengan berbagai nama antara lain:

- Sunda : campedak, cempedak, angka beurit.
- Jawa : campedak, cepedak, cempedak, angka cina.
- Madura : angka comedak, comedak, cempedak (Backer & Van Den Brink, 1965).
- Irian Jaya : cempedak.

### 2.1.3 Deskripsi Tanaman

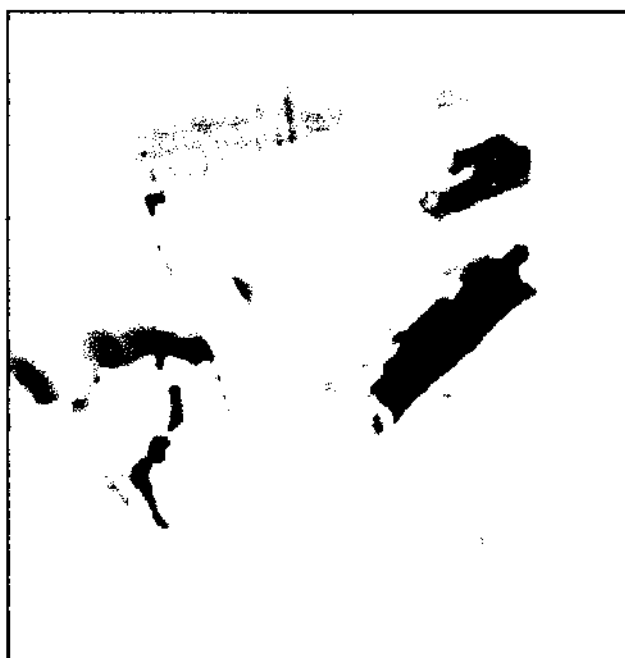
- Habitus** : Pohon berumah satu, tinggi 10-20 m, liar atau ditanam, berbuah pada Juli sampai September.
- Batang** : Membulat dengan banyak getah yang rekat.
- Daun** : Helaian daun eliptis sampai memanjang atau bulat telur terbalik 10-25 x 5-10 cm dengan tangkai 1-3 cm, terdapat banyak trikoma pada bagian tulang daun, pangkal pendek. yang menyempit, tepi rata, serupa kulit, dari atas mengkilat, hijau tua. Daun penumpu bulat telur memanjang.
- Bunga** : Karang bunga jantan atau betina. Bulir betina berbentuk gada memanjang, bunga tenggelam pada poros, bagian yang bebas panjangnya  $\pm 3$  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 (Morton, 1987).



[A]

[B]

Gambar 2.1 Tanaman [A] dan buah [B] *Artocarpus champeden* Spreng.



Gambar 2.2 Kulit batang *Artocarpus champeden* Spreng.

#### 2.1.4 Kandungan Kimia

Pada kulit batang terdapat senyawa flavonoid siklocampedol bersama-sama dengan empat senyawa triterpen, yakni sikloeukalenol, glutinol, sikloartenon dan 24-metilensikloartenon serta suatu sterol,  $\beta$ -sitosterol. Selain itu jaringan kayu dan

kulit batang *Artocarpus champeden* masing-masing mengandung senyawa flavonoid yaitu artokarpin dan heteroflavanon-A (Hakim dkk, 1998). Menurut Achmad (2004) *A. champeden* mengandung beberapa jenis flavonoid yang dapat dikelompokkan menjadi tujuh macam, 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, 5'-hidroksikudraflavon dan sikloheterofilin
- dihidrobenzosanton : artoindonesianin T, artoindonesianin S, artoindonesianin V, artonin
- furanodihidrobenzosanton : artoindonesianin M, artonin A dan artoindonesianin A.

### 2.1.5 Kegunaan Tanaman

*A. champeden* Spreng., yang dikenal sebagai cempedak, adalah tumbuhan pangan yang endemik untuk Indonesia, kayunya keras, awet dan digunakan sebagai bahan bangunan (Heyne, 1987). Buah dan bijinya digunakan sebagai bahan pangan, sedangkan beberapa bagian tanaman yang lain digunakan untuk bahan ramuan obat

tradisional, antara lain digunakan sebagai obat demam, disentri, malaria dan penyakit kulit. Selain itu diketahui bahwa senyawa artokarpin dan siklocampedol dari ekstrak kulit batang cempedak memberikan toksisitas yang tinggi terhadap *Artemia salina* pada uji *brain shrimp* sehingga diduga memiliki aktivitas antitumor (Hakim dkk, 1998).

### 2.1.6 Penelitian yang Telah Dilakukan Terhadap *Artocarpus champeden* Spreng.

Penelitian terhadap *A. champeden* Spreng. yang berkaitan dengan aktivitasnya pada parasit malaria telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Dhani dan kawan-kawan (2003) meneliti aktivitas ekstrak metanol dan mendapatkan hasil bahwa ekstrak metanol mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei* secara *in vivo* pada mencit coba. Agriana dan kawan-kawan meneliti aktivitas fraksi klorofom secara *in vivo* dan hasilnya menunjukkan bahwa fraksi kloroform memiliki aktivitas antiplasmodial pada mencit yang diinfeksi *P. berghei*. Penelitian yang dilakukan oleh Widyawaruyanti dan kawan-kawan menunjukkan bahwa ekstrak DCM kulit batang *A. champeden* memiliki aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P. falciparum* dengan nilai  $ED_{50}$  4,86043  $\mu\text{g/ml}$  dan *in vivo* pada *P. berghei* dengan nilai  $ED_{50}$  1,40324 mg/kg berat badan.

Penelitian mengenai kandungan *A. champeden* Spreng. juga telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Hakim dan kawan-kawan (1998) menyatakan ada tiga golongan senyawa yang terdapat pada kulit batang *A. champeden* Spreng. yaitu golongan flavonoid, terpenoid dan sitosterol. Menurut Achmad (2004) flavonoid merupakan golongan senyawa utama yang terdapat dalam *A. champeden* Spreng.

Achmad mengelompokkan senyawa-senyawa flavonoid tersebut menjadi tujuh golongan yaitu flavanon, flavon, 3-prenilflavon, oksepinoflavon, piranoflavon, dihidrobenzosanton, furanodihidrobenzosanton.

## 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 yang lama dikenal mempunyai berbagai aktivitas farmakologi termasuk antimalaria kuinin merupakan antimalaria alami yang sudah lama dikenal. Beberapa alkaloid baru yang mempunyai aktivitas sebagai antimalaria telah berhasil diisolasi dari beberapa tanaman misalnya bisbenzilisokuinolin dan naftiisokuinolin.

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

Alkaloid golongan naftiisokuinolin 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 0,021 – 0,33  $\mu\text{g/ml}$ . Lebih lanjut dibuktikan dionkopolin C mempunyai aktivitas antiplasmodial *in vitro* pada *P. falciparum* ( $IC_{50}$  0,015  $\mu\text{g/ml}$ ).

b. Golongan terpenoid

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

Beberapa quasinoind antara lain ailantinon, brusatol, bruseantin, bruseantinol, 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 kloroquin. Bahkan salah satu diantaranya yaitu artemisin 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 kloroquin. Garciniaxanton memiliki nilai  $IC_{50}$  0,96  $\mu\text{g/ml}$  terhadap pertumbuhan *P. falciparum*.

Senyawa flavonoid yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* didapatkan tidak 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, 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  $\mu$ M, 2,6  $\mu$ M dan 2,1  $\mu$ M (Kim dkk., 2004). Senyawa likokhalkon A yang diisolasi dari akar dan rimpang berbagai spesies *Glycyrrhiza* L. memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* 3D7 dengan  $IC_{50}$  2,1  $\mu$ g/ml (Ziegler dkk., 2004).

### 2.3 Tinjauan tentang Ekstraksi dan Pemisahan

Ekstraksi suatu bahan tanaman tergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tersebut dan juga senyawa yang akan diisolasi. Umumnya menggunakan pelarut dari yang kurang polar sedikit demi sedikit meningkat sampai yang paling polar. Pelarut yang bersifat non polar seperti petroleum eter dan heksana. Pelarut yang kurang polar seperti eter, kloroform dan diklorometana. Pelarut yang bersifat polar seperti etanol, air atau campuran keduanya. Zat-zat kimia yang terekstraksi dengan pelarut non polar adalah minyak atsiri, lemak, steroid dan karotenoid, sedangkan yang terekstraksi dengan pelarut semi polar adalah senyawa-senyawa alkaloid bebas, senyawa-senyawa alkaloid bebas yang meliputi asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid, antraknon, xanton dan stilben. Senyawa-senyawa yang



terekstraksi dengan pelarut polar adalah garam-garam alkaloid, glikosida, saponin dan tanin (Depkes RI, 1987). Ekstraksi yang berdasarkan pada perbedaan kepolaran senyawa kandungan ini berguna untuk telaah profil fitokimia dari suatu tumbuhan sebelum dilakukan kromatografi atau pemisahan selanjutnya (Harborne, 1987).

Prosedur isolasi senyawa dari tumbuhan juga sangat beragam sesuai dengan ragam zat kandungan yang akan diisolasi. Salah satu hal yang harus diperhatikan adalah menghindari kerusakan zat kandungan karena panas atau reaksi enzimatik. Untuk pemurnian senyawa, metode kromatografi merupakan metode yang paling disukai. Dengan kromatografi kolom, campuran zat-zat kandungan dapat dipisahkan menjadi fraksi-fraksi yang cukup jumlahnya untuk dilakukan berbagai uji aktivitas (Robinson, 1983).

### **2.3.1 Kromatografi Lapisan Tipis**

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran zat yang didasarkan atas perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponen pada fase diam di bawah pengaruh fase gerak/pelarut yang bergerak. Bisa dipakai suatu lapis tipis adsorben yang ditaburkan pada bahan yang inert sebagai fase diam. Campuran yang dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan bentuk bercak atau pita, kemudian dikembangkan dalam bejana dengan larutan pengembang yang sesuai, maka campuran senyawa kimia tersebut akan bergerak melintasi fase diam dengan kecepatan yang berbeda tergantung kelarutannya pada pelarut pengembang dan kecenderungan senyawa tersebut melekat pada fase diam (Hefman, 1975; Gritter, 1991).

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada kromatogram (KLT) adalah nilai  $R_f$  (*Retardation factor*), yaitu hasil bagi jarak noda titik awal dengan jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal. Setiap zat akan memiliki nilai  $R_f$  yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1981).

### 2.3.2 Kromatografi Kolom

Pada kromatografi kolom dibutuhkan kolom pemisah berupa suatu tabung yang diisi dengan bahan pengadsorpsi dan juga pelarut pengembang yang berbeda. Sampel dilarutkan dalam pelarut sesedikit mungkin dan pelarut ini sama dengan pelarut yang digunakan mengeluasi. Sampel yang berbentuk kental disiapkan dengan mencampur sampel dan silika gel. 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 paling kurang polar ke yang paling polar (Roth, 1988).

### 2.3.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) ditinjau dari sistem peralatannya termasuk kromatografi kolom, karena fase diamnya diisikan di dalam kolom. Proses pemisahannya bisa secara adsorpsi atau partisi, tergantung apakah fase diamnya butiran zat padat murni atau disalut dengan cairan. Keuntungan analisis dengan KCKT diantaranya adalah daya pisahnya yang baik dan prosesnya yang relatif singkat, yakni kurang dari 1 jam.

Dalam banyak hal KCKT menghasilkan daya pisah yang sama dengan kromatografi gas. Kelebihannya KCKT dapat dilakukan tanpa pembuatan turunan senyawa ( Mulya dan Suharman, 1995; Johnson, 1991).

## 2.4 Tinjauan tentang Spektrometri

### 2.4.1 Spektrometri UV-Vis

Spektrometri UV-Vis merupakan teknik analisis yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dan sinar tampak. Radiasi UV-Vis yang diserap oleh suatu molekul mengakibatkan terjadinya transisi elektron, yaitu promosi elektron dari tingkat energi rendah ke tingkat energi tinggi. Panjang gelombang sinar UV atau sinar tampak yang diserap bergantung pada mudahnya promosi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek, demikian pula sebaliknya.

Ada enam jenis transisi yang mungkin, tetapi yang bermanfaat adalah transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  untuk senyawa dengan ikatan rangkap terkonyugasi serta beberapa transisi  $n \rightarrow \sigma^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$ . Transisi  $n \rightarrow \sigma^*$  dimiliki oleh gugus-gugus yang mempunyai elektron bebas seperti  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OCH}_3$ . Gugus-gugus ini dikenal sebagai gugus aoksokrom. Terikatnya gugus aoksokrom akan mengakibatkan pita absorpsi bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang (Mulya dan Suharman, 1995; Fessenden, 1986).

### 2.4.2 Spektrometri Inframerah

Spektrometri inframerah merupakan salah satu alat yang penting dalam penentuan struktur senyawa organik. Spektrum inframerah memberikan gambaran mengenai gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam sebuah 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 menyerap energi dengan panjang gelombang tertentu. Misalnya suatu senyawa yang memiliki ikatan O-H atau N-H akan menyerap energi dengan panjang gelombang 2,7 – 3,3  $\mu\text{m}$ . Jika spektrum inframerah suatu senyawa menunjukkan serapan pada daerah ini, dapat diduga bahwa senyawa tersebut memiliki gugus O-H atau N-H. Sebaliknya jika dalam daerah ini spektrumnya tidak menunjukkan pita absorpsi dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut tidak mengandung gugus O-H atau N-H.

### 2.4.3 Spektrometri Resonansi Magnetik Inti

Spektrometri resonansi magnetik inti (RMI) didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul tersebut berada dalam medan magnet yang kuat. Spektrum RMI memberikan gambaran mengenai atom-atom terutama hidrogen dalam sebuah molekul.

Di alam terdapat inti-inti atom yang mempunyai spin (misalnya  $^1_1\text{H}$  dan  $^{13}_6\text{C}$ ) dan yang tidak mempunyai spin (misal  $^{12}_6\text{C}$  dan  $^{16}_8\text{O}$ ). Yang dimanfaatkan dalam RMI adalah inti-inti yang mempunyai spin, yang paling lazim dipelajari adalah  $^1_1\text{H}$  (proton). Suatu inti yang mempunyai spin akan berputar dan menghasilkan medan magnet kecil yang disebut momen magnetik inti, suatu vektor.

Bila molekul yang mengandung atom hidrogen diletakkan dalam suatu medan magnet luar  $H_0$ , maka momen magnetik dari tiap proton akan berada pada salah satu orientasi, yaitu paralel (searah) dan antiparalel (berlawanan arah) terhadap medan luar tersebut. Keadaan paralel berenergi lebih rendah dibanding keadaan antiparalel. Bila dikenai gelombang radio yang frekuensinya sesuai, proton paralel akan menyerap energi dan membalik ke keadaan antiparalel. Proton tersebut berada dalam keadaan resonansi. Besarnya energi yang diperlukan untuk beresonansi sebanding dengan besarnya  $H_0$ .

Pada  $H_0$  tertentu proton-proton beresonansi pada radio frekuensi yang berbeda-beda karena proton tidak hanya mengalami  $H_0$  tetapi juga mengalami medan magnet molekul imbasan, yakni medan magnet kecil yang terimbas oleh  $H_0$ . Besarnya medan magnet imbasan ini tidak sama karena proton-proton dalam satu 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).

## 2.5 Tinjauan tentang Malaria

### 2.5.1 Penyakit Malaria

Penyakit malaria telah diketahui sejak jaman Yunani kuno, namun penyebabnya baru diketahui pada abad ke-19, setelah Laveran melihat “bentuk pisang” dalam darah seorang penderita malaria. Kemudian baru diketahui bahwa malaria ditularkan oleh nyamuk yang terdapat di rawa-rawa. Nama malaria berasal dari bahasa Italia “mal’aria” yang berarti udara buruk, karena penyakit ini banyak terdapat di daerah rawa yang berbau busuk (Bruce,1986; Gandahusada, 1990).

Penyakit malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit bersel tunggal yaitu protozoa yang termasuk dalam marga *Plasmodium*, yang mempunyai habitat dalam sel darah merah (eritrosit) dan sel hati. *Plasmodium* ini mempunyai 4 spesies yang bersifat parasitik bagi manusia yaitu *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* dan *P.ovale*. Parasit ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk betina marga *Anopheles*. Malaria ditandai dengan gejala klinis yang khas yaitu demam tinggi, paroksismal, menggigil, anemia dan splenomegali. Dari keempat jenis *Plasmodium* tersebut yang paling patogen adalah *P. falciparum* karena kemampuannya menyerang eritrosit muda dan tua serta memiliki resiko kematian yang tinggi pada individu non-imun (Schlesinger. 1988). Infeksi *P. falciparum* banyak ditemukan di daerah tropik dan sub tropik karena pada suhu kurang dari 20 °C siklus hidup *Plasmodium* di dalam tubuh nyamuk terhambat. Di Indonesia parasit ini tersebar di seluruh kepulauan (Boyd, 1970; Gandahusada, 1990).

### 2.5.2 Tinjauan tentang *P. falciparum*

#### 2.5.2.1 Morfologi *P. falciparum*

*P. falciparum* mempunyai 4 bentuk yaitu:

1. Bentuk cincin, mempunyai diameter kurang lebih 1  $\mu\text{m}$ , tipis, mempunyai nukleus yang berbentuk batang atau terbagi menjadi 2 granul.
2. Bentuk trophozoit, sangat kecil dan halus dengan ukuran  $\pm$  seperenam diameter eritrosit.
3. Bentuk Skizon, ukuran  $\pm$  30  $\mu\text{m}$  pada hari ke-4 setelah infeksi dan skizon mempunyai titik-titik kasar yang tampak jelas (titik Maurer) tersebar pada 2/3 bagian eritrosit.
4. Gametosit, ada dua macam bentuk gametosit yaitu makrogamet atau gametosit betina dan mikrogamet atau gametosit jantan. Makrogamet biasanya lebih langsing dan panjang dari mikrogamet, sitoplasmanya lebih biru dengan pulasan Romanowsky/giemsa. Intinya lebih kecil dan padat, berwarna merah tua dan butir-butir pigmen tersebar disekitarnya. Mikrogamet berwarna biru lemah atau kemerahan dan intinya berwarna merah muda, besar dan tidak padat, butir-butir pigmen tersebar di sitoplasma sekitar inti.

#### 2.5.2.2 Siklus Hidup *P. falciparum*

Siklus hidup *P. falciparum* dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung sporozoit menggigit manusia. Sporozoit-sporozoit yang masuk bersama ludah nyamuk masuk ke peredaran darah. Dalam waktu yang singkat (30 menit) semua sporozoit menghilang dari peredaran darah, masuk ke sel-sel parenkim hati. Dalam sel-sel hati sporozoit membelah secara aseksual, dan berubah menjadi skizon hati (skizon kriptozoik). Seluruh proses tadi disebut fase pre-eritrositik. Siklus tadi memerlukan waktu antara 6 sampai 12 hari untuk menjadi lengkap. Sesudah skizon

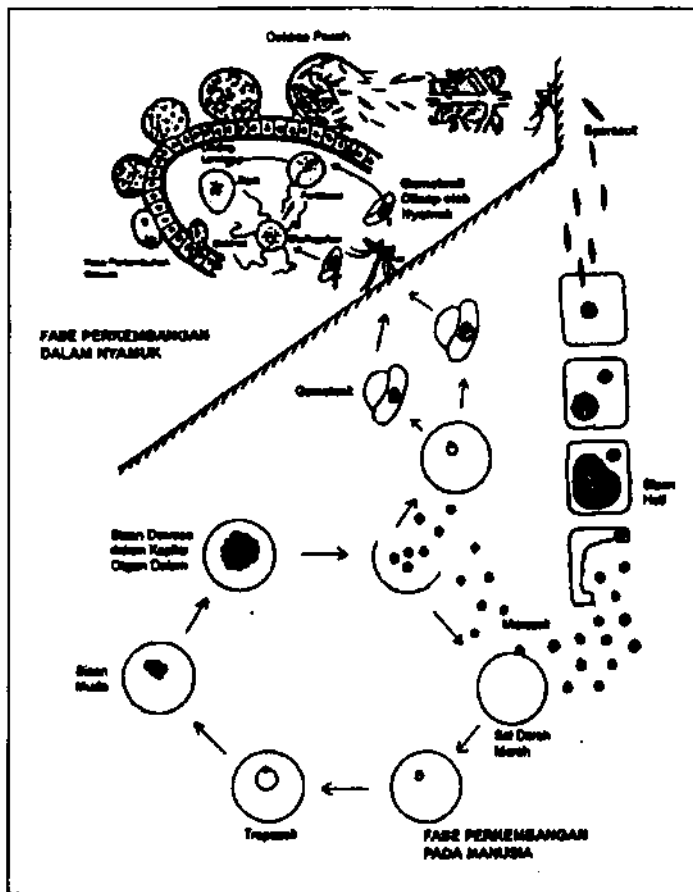
kriptozoik matang, bentuk ini bersama sel hati yang diinfeksi pecah dan mengeluarkan antara 5.000 sampai 30.000 merozoit yang segera masuk ke sel-sel darah merah.

Dalam sel darah merah, merozoit-merozoit berubah menjadi trofozoit muda (bentuk cincin). Trofozoit muda tumbuh menjadi trofozoit dewasa dan selanjutnya membelah diri menjadi skizon. Skizon yang sudah matang dengan merozoit-merozoit di dalamnya pecah bersama sel darah merah yang diinfeksi, dan merozoit-merozoit tersebut kembali menginfeksi sel-sel darah merah lain untuk kembali mengulang siklus tadi. Keseluruhan siklus yang terjadi berulang dalam sel darah disebut siklus eritrositik aseksual atau skizogoni darah. Peristiwa pecahnya skizon-skizon bersama sel-sel darah merah yang diinfeksi disebut proses sporulasi, dan ini berhubungan dengan munculnya gejala-gejala malaria yang ditandai dengan demam dan menggigil secara periodik.

Setelah siklus skizogoni darah berulang beberapa kali, beberapa merozoit berubah menjadi gametosit di dalam sel darah merah, yang terdiri dari gametosit jantan dan betina. Siklus ini disebut siklus eritrositik seksual atau gametogoni. Jika gametosit yang matang dihisap oleh nyamuk *Anopheles*, di dalam lambung nyamuk terjadi proses eksflagelasi pada gametosit jantan, yaitu dikeluarkannya 8 sel gamet jantan yang bergerak aktif mencari sel gamet betina. Selanjutnya pembuahan terjadi antara satu sel gamet jantan (mikrogamet) dan satu sel gamet betina (makrogamet), menghasilkan zigot dengan bentuknya yang memanjang, lalu berubah menjadi ookinet dan bergerak aktif menembus mukosa lambung. Di dalam dinding mukosa paling luar ookinet mengalami pembelahan inti menghasilkan sel-sel yang memenuhi kista yang membungkusnya, disebut ookista. Di dalam ookista dihasilkan



puluhan ribu sporozoit, kemudian ookista pecah dan menyebarkan sporozoit-sporozoit yang berbentuk seperti rambut ke seluruh bagian rongga badan nyamuk dan dalam beberapa jam saja menumpuk di dalam kelenjar ludah nyamuk (Sutisna, 2003).



Gambar 2.3 Siklus hidup *Plasmodium falciparum* (dikutip dari Sutisna, 2003)

## 2.6 Tinjauan tentang Uji Antimalaria secara *In Vitro*

Untuk pengujian aktivitas antimalaria secara *in vitro* digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas teknik dari Reickmann dan kawan-kawan yang kemudian disempurnakan oleh WHO tahun 1982 (WHO, 1985).

Bahan uji dilarutkan dalam DMSO, diencerkan sampai kadar tertentu dalam medium RPMI 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 nM HEPES dan 25

mM NaHCO<sub>3</sub>. Larutan disterilkan dengan saringan diameter 0,45µm dan diencerkan secara seri.

Masing-masing lempeng sumur mikro diisi dengan larutan bahan uji dan ditambahkan 180 µL suspensi 10% eritrosit dengan parasitemia 1% sehingga masing-masing sumur berisi 200 µL medium yang mengandung serum dan bahan uji yang diteliti.

Lempeng sumur mikro diletakkan dalam desikator kaca yang diberi lilin yang berguna untuk menghilangkan oksigen. Lilin dinyalakan, desikator ditutup sementara kran udara pada tutup desikator dibuka. Setelah lilin padam, kran udara ditutup, diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah itu lempeng sumur mikro dikeluarkan, sediaan uji dicampur sampai homogen dan disentrifuse, filtratnya dibuang dan bagian yang pekat dibuat sediaan lapisan darah tetes tipis dengan tiga kali pengulangan. Sediaan dikeringkan pada suhu kamar, difiksasi dengan metanol, kemudian setelah kering diwarnai dengan larutan giemsa 3% dalam pH 6,9-7,2 selama 1 jam. Evaluasi dilakukan dengan cara menghitung persen penghambatan (parasitemia) terhadap pertumbuhan *P. falciparum* terhadap 5000 eritrosit (Noster, 1990).



## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka Konseptual

Tanaman *A. champeden* Spreng. yang termasuk dalam suku Moraceae atau dikenal dengan nama daerah cempedak tumbuh terpusat di Asia Tenggara dan banyak ditemukan di Indonesia. Tanaman ini digunakan sebagai bahan ramuan obat tradisional antara lain sebagai obat malaria, disentri dan penyakit kulit (Hakim dkk, 1998).

*A. champeden* Spreng. mengandung senyawa golongan flavonoid antara lain artokarpin, heteroflavon-A dan siklocampedol bersama dengan senyawa triterpen sikloeukalenol, glutinol, sikloartenon dan 24-metilensikloartanon serta suatu sterol,  $\beta$ -sitosterol. Menurut Achmad (2004), *A. champeden* mengandung suatu campuran yang kompleks dari berbagai jenis flavonoid dan yang menjadi ciri khasnya adalah substituen isoprenil yang terikat pada atom C-3. Struktur molekul yang demikian merupakan ciri khas senyawa-senyawa 3-prenilflavon dan merupakan indikator kemotaksonomi dari suku Moraceae.

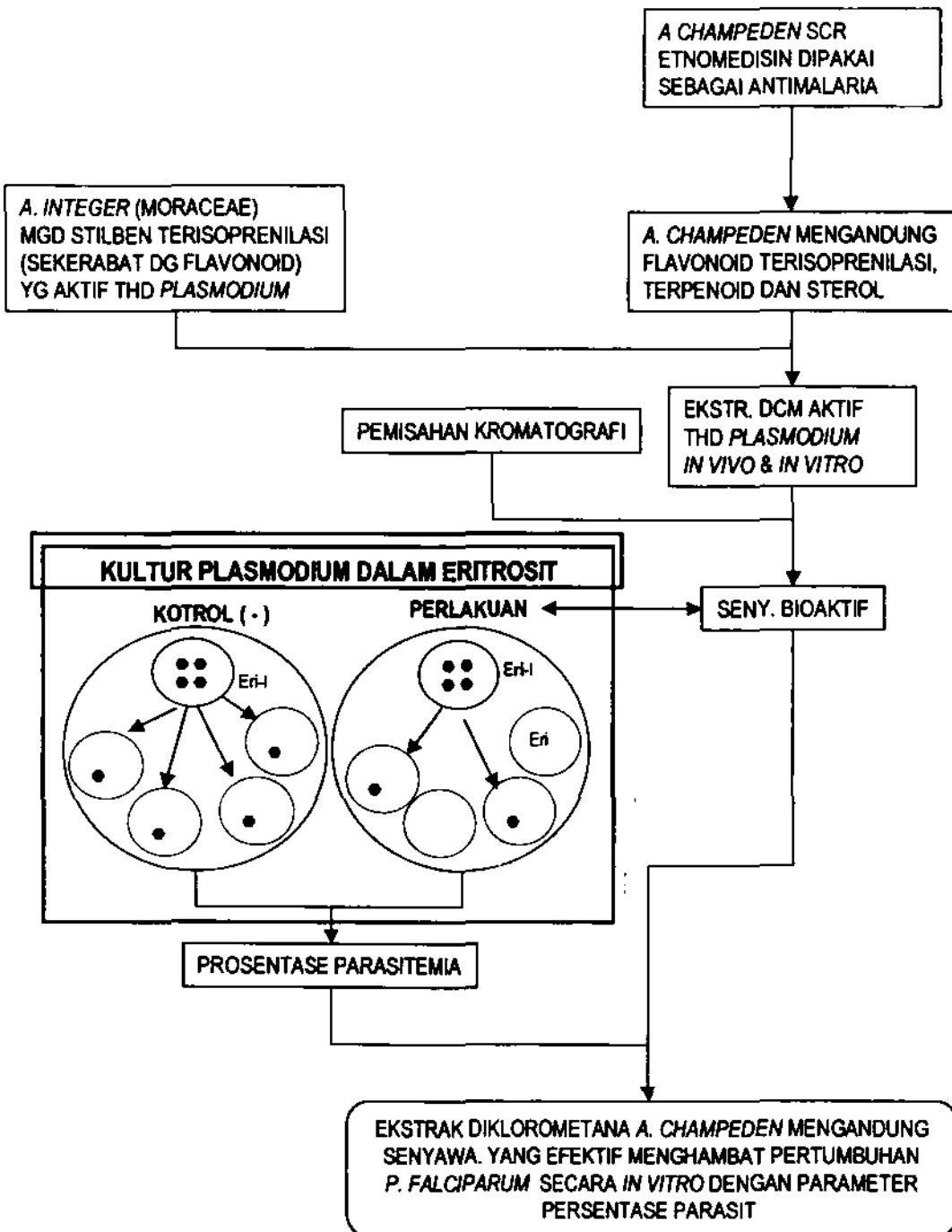
Tanaman lain dari suku Moraceae, yaitu *A. integer* dilaporkan oleh Boonlaksiri dkk. (2000) mengandung senyawa stilbene terisoprenilasi (yang kerangka utamanya mirip dengan senyawa flavonoid) memiliki aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P. falciparum* dengan nilai  $IC_{50}$  pada 1.7  $\mu$ g/ml.

Dhani dan kawan-kawan (2003) melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* mempunyai aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *P. berghei* dengan  $IC_{50}$  6,95419 mg/kg BB. Sedangkan Agriana (2003) melaporkan

bahwa fraksi kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* juga memiliki aktivitas antimalaria *in vivo*. Penelitian yang dilakukan oleh Widyawaruyanti dan kawan-kawan (2004) menunjukkan bahwa ekstrak DCM kulit batang *A. champeden* memiliki aktivitas antimalaria *in vitro* pada *P. falciparum* dengan nilai  $IC_{50}$  4,86043  $\mu\text{g/ml}$  dan *in vivo* pada *P. berghei* dengan nilai  $IC_{50}$  1,40324 mg/kg berat badan.

Oleh sebab itu diduga kulit batang tanaman *A. champeden* mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas antimalaria dan cukup prospektif untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria. Senyawa tersebut diisolasi dengan teknik-teknik kromatografi dan diujikan pada kultur eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum*, sehingga dapat diketahui aktivitas antimalariannya.

Skema kerangka konseptual sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual tersebut di atas, maka dapat dikemukakan hipotesis penelitian sebagai berikut:

Ekstrak diklorometana kulit batang *A. Champeden* Spreng. mengandung senyawa yang efektif menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, menggunakan analisis probit untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  dengan membuat kurva hubungan antara probit persentase penghambatan dengan logaritma kadar. Pada penelitian ini, sebagai variabel bebas adalah macam kadar isolat dan variabel tergantung adalah persen penghambatan terhadap *P. falciparum* secara *in vitro*. Sedangkan sebagai variabel terkendali adalah cara sterilisasi, parasitemia awal ( $D_0$ ), media kultur, metode pengukuran parasit

#### 4.2 Bahan Penelitian

Sampel kulit batang *A. champeden* yang digunakan diambil dari Desa Makbalim, distrik Salawati, Kabupaten Sorong, Irian Jaya Barat dan diidentifikasi di Balai Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Teknik pengambilan dilakukan secara acak pada tempat dan waktu yang tidak ditentukan. Kulit batang cempedak dikeringkan dengan diangin-anginkan di udara terbuka, kemudian setelah kering digiling.

Untuk uji *in vitro* : air suling, RPMI 1640 (Royal Parla Memorial Institute, suatu media penumbuh parasit), HEPES buffer, natrium bikarbonat, gentamisin sulfat, serum manusia, eritrosit manusia, minyak imersi, pewarna giemsa, dan dapar fosfat.

### **4.3 Alat Penelitian**

Kolom kromatografi, mikropipet (socorex), bak kromatografi (camag), rotavapor (buchi R-114 dan buchi R-153), timbangan analitik (ohaus 2140), pipet ukur dan pipet volume, laminar air flow, inkubator, autoklaf, lemari pendingin, eksikator, mikroskop (olympus CH 20), disposable syringe, penyaring membran pipet 0,22  $\mu\text{m}$ , lempeng sumur mikro, botol medium steril (scoot), alat-alat tabung sentrifuse bertutup, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Hewlett Packard Agilent 1100), Spektrofotometer UV-Vis ( Perkin Elmer Lambda EZ 201), Spektrofotometer FTIR (Perkin Elmer), Spektrometer FT-NMR (Hitachi R-1900).

### **4.4 Prosedur Penelitian**

#### **4.4.1 Penyiapan bahan**

##### **4.4.1.1 Pembuatan Ekstrak Diklorometana**

Serbuk kulit batang cempedak ditimbang  $\pm 1$  kg, kemudian dimaserasi dengan 5 liter n-heksana selama 24 jam dan diulangi 3 kali. Maserat disaring hingga didapatkan ekstrak cair n-heksana. Pelarut n-heksana diuapkan dengan menggunakan rotavapour.

Residu diekstraksi kembali dengan menggunakan cara yang sama memakai pelarut diklorometana. Setelah diperoleh ekstrak diklorometana, pelarut diuapkan menggunakan rotavapour hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental dikeringkan dalam lemari asam, didapatkan ekstrak kering.

##### **4.4.1.2 Fraksinasi Ekstrak Diklorometana dengan Kromatografi Kolom Vakum**

Ekstrak kering DCM difraksinasi menggunakan kromatografi kolom vakum.



Bahan : Ekstrak DCM  
Fase diam : Silika gel 60  
Fase gerak : n-heksana : diklorometana : metanol dengan penurunan gradien konsentrasi 5%

Cara kerja :

1. Fase diam silika gel 60 dimasukkan ke dalam *sintered glass* sedikit demi sedikit, ditekan-tekan sambil dihisap dengan pompa hisap agar mampat sampai setinggi  $\pm$  5 cm untuk diameter kolom 2,5-3 cm.
2. Ekstrak DCM yang akan dipisahkan dilarutkan dalam diklorometana, kemudian dicampur dengan fase diam dalam jumlah yang sama, selanjutnya diaduk sampai homogen kemudian dikeringkan. Masukkan dalam *sintered glass* di atas fase diam kemudian pada bagian atas ditutup dengan kertas saring.
3. Fase gerak pertama yang dituang ke dalam *sintered glass* adalah n-heksana. Untuk mempercepat aliran fase gerak ditarik dengan pompa hisap sampai cairan tidak menetes lagi. Cairan tersebut ditampung dalam vial dan diberi tanda.
4. Selanjutnya fase gerak yang kedua dimasukkan dalam *sintered glass* dan ditarik dengan pompa hisap sampai cairan tidak menetes lagi. Demikian seterusnya sampai fase gerak terakhir.
5. Setelah semua selesai, pada masing-masing fraksi yang dihasilkan dilakukan uji kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang sesuai dan disemprot dengan penampak noda.
6. Untuk fraksi yang memberikan noda dan harga R<sub>f</sub> yang sama dikumpulkan menjadi satu, diuapkan dan ditimbang.
7. Masing-masing fraksi diuji aktivitas antimalaria.

#### 4.4.1.3 Isolasi Fraksi Diklorometana dengan Kromatografi Kolom Lambat

Fraksi yang memiliki aktivitas antimalaria dipisahkan dengan kromatografi kolom terbuka.

Bahan : Fraksi aktif ekstrak DCM

Fase diam : Silika gel 60

Fase gerak : n-heksana – etilasetat

Cara kerja :

1. Disiapkan kolom, fase diam silika gel 60 sebanyak 50 g yang telah disuspensikan dengan eluen dimasukkan ke dalamnya dan didiamkan semalam.
2. Ditimbang 0,5 g fraksi aktif, dilarutkan dengan eluen, kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang sudah berisi fase diam. Eluasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak dengan kepolaran yang meningkat yaitu kombinasi n-heksana – etilasetat.
3. Dilakukan KLT preparatif dengan fase diam silika gel RP-8 dan eluen asetonitril:metanol:air (2:2:1)
4. Isolat yang dihasilkan diuji aktivitas antimalaria.

#### 4.4.2 Analisis Ekstrak, Fraksi dan Isolat Kulit Batang *A. champeden* dengan KCKT

Sejumlah bahan dilarutkan dalam campuran asetonitril : metanol : air (3:3:4) 0,5 ml sampai larut. Disuntikkan ke dalam kolom sebanyak 0,2 ml, kemudian direkam profilnya.

### **4.4.3 Identifikasi Isolat**

#### **4.4.3.1 Identifikasi dengan Spektroskopi UV-Vis**

Sejumlah bahan dilarutkan dalam metanol p.a. sampai larut. Dimasukkan dalam kuvet dan disusur pada panjang gelombang 200 – 600 nm.

#### **4.4.3.2 Identifikasi dengan Spektroskopi Inframerah**

Sejumlah kecil bahan digerus sampai homogen dengan kalium bromida bebas air. Kemudian dikompresi sampai terbentuk pelet yang transparan. Pelet ini dimasukkan ke dalam *sampel holder* dan direkam spektrumnya.

#### **4.4.3.3 Identifikasi dengan Spektroskopi RMI**

Kurang lebih 4 mg bahan dilarutkan dalam 0,5 ml  $\text{CDCl}_3$  dan dimasukkan ke dalam tabung sampel. Kedalam larutan tersebut ditambahkan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal. Kemudian dimasukkan alat di antara dua kutub magnet dan direkam spektrumnya.

### **4.4.4 Prosedur Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro***

#### **4.4.4.1 Persiapan Medium**

##### **Medium Tak Lengkap (*Incomplete Medium*)**

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. Kemudian larutan disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22  $\mu\text{m}$ , dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4 °C. Ini disebut juga medium

pencuci (*washing medium*) dan bila akan digunakan, dimasukkan inkubator suhu 37 °C terlebih dahulu.

### **Persiapan Serum**

Diambil darah segar golongan O yang sudah ditambah antikoagulan, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Plasma diambil dengan pipet pasteur dan di-*heat inactivation* pada suhu 56 °C selama 30 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C untuk mengendapkan fibrin, sehingga didapatkan serum. Penyimpanan pada suhu -20 °C dan bila akan digunakan, dihangatkan pada suhu 37 °C.

### **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. Medium ini digunakan untuk membiakkan *P. falciparum*.

#### **4.4.4.2 Persiapan Eritrosit 50%**

Darah manusia golongan O yang diberi antikoagulan disimpan pada suhu 4 °C dapat digunakan tidak lebih dari 3 minggu. Darah dimasukkan dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. 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. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali. Eritrosit yang telah dicuci (bebas dari leukosit) ditambah dengan medium lengkap dengan volume yang sama untuk membuat eritrosit 50%

dan disimpan pada suhu 4 °C. Eritrosit yang telah dicuci dapat digunakan tidak lebih dari dua minggu.

#### 4.4.4.3 Prosedur Biakan

Prosedur biakan ini didasarkan pada metode Treger dan Jensen. Biakan dilakukan pada cawan petri dan dikerjakan secara aseptik. Parasit diperoleh dari simpanan beku yang *dithawing* dengan cara berikut ini :

- Tabung yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37 °C. Ditambahkan dengan volume yang sama NaCl 3,5% dan dipindahkan ke tabung sentrifus menggunakan pipet pasteur sambil dicampur perlahan.
- Kultur disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dibuang.
- Endapan disuspensikan dengan 5 ml medium tak lengkap, dicampur perlahan-lahan dengan pipet pasteur kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dibuang. Prosedur ini dilakukan sebanyak dua kali
- Setelah endapan dicuci, sebanyak 4,5 ml medium lengkap dan 0,5 ml eritrosit 50% ditambahkan kemudian dicampur perlahan menggunakan pipet.
- Kultur dipindahkan ke dalam cawan petri, dimasukkan dalam *candle jar* dan selanjutnya disimpan di dalam inkubator yang bersuhu 37 °C.
- Selanjutnya dilakukan penggantian medium, sebanyak 4,5 ml medium lengkap ditambahkan ke dalam kultur setiap hari. Bila tingkat parasitemianya lebih dari 2% dapat dilakukan sub biakan

#### 4.4.4.4 Sub Biakan

Eritrosit yang terinfeksi parasit malaria disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. *Packed cells* disuspensi dengan medium lengkap volume sama untuk membuat suspensi 50%, selanjutnya dibagi-bagi dalam cawan petri yang baru dan ditambah suspensi eritrosit 50% baru untuk membuat parasitemia 0,5-1%. Kemudian ditambah medium lengkap untuk mendapatkan hematokrit 5% dan diinkubasi kembali.

#### 4.4.4.5 Uji Aktivitas *In Vitro*

Untuk melakukan uji aktivitas antimalaria *in vitro* diperlukan *P. falciparum* yang pada penelitian ini tanpa dilakukan sinkronisasi. Pada uji aktivitas ini digunakan *P. falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap kloroquin. Secara prinsip uji aktivitas dilakukan dengan cara berikut : Bahan uji dilarutkan dalam DMSO. 20 µl larutan tersebut diencerkan dengan 180 µl medium lengkap hingga diperoleh berbagai macam kadar. 50 µl larutan uji yang telah diencerkan dimasukkan ke lempeng sumur mikro, kemudian ditambahkan 950 µl suspensi parasit dan diinkubasi selama 48 jam. Uji ini dilakukan dua kali replikasi.

#### Penyiapan Suspensi Sel Parasit

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

#### Penyiapan Bahan Uji

Sebagai bahan uji adalah ekstrak diklorometana dan fraksi ekstrak diklorometana yang dihasilkan dalam proses isolasi kulit batang *A. champeden* Spreng. dengan konsentrasi 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 µg/ml. Sedangkan untuk isolat

dibuat konsentrasi 0,0001 ; 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10  $\mu\text{g/ml}$ . Penyiapan bahan uji ini dikerjakan pada kondisi aseptis.

#### **Pembuatan Larutan Pembanding Klorokuin Difosfat**

Sebagai kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$  dengan pelarut aquabidestilata. Sedangkan untuk pembanding dibuat konsentrasi 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **Kontrol Negatif**

Kontrol negatif adalah pelarut yang dipakai seperti pada bahan uji (dimetilsulfoksida) sebanyak 50  $\mu\text{l}$ . Kemudian diencerkan sedemikian rupa sehingga di dalam sumur mikro (1000  $\mu\text{l}$ ) diperoleh kadar dimetilsulfoksida 0,5%.

#### **4.4.5 Evaluasi Hasil Uji Efek Antimalaria**

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tipis (*monolayer*) yang diwarnai dengan giemsa 20% dalam aqua. Kemudian setelah didiamkan selama 10 menit, dicuci dengan aqua dan dikeringkan. Selanjutnya dihitung persentase parasitemia dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit di bawah mikroskop.

Persentase parasitemia dihitung dengan rumus :

$$\% \text{Parasitemia} = \frac{\Sigma \text{eritrosit yang terinfeksi}}{5000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Persentase penghambatan dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - \left[ \frac{X_p}{X_k} \times 100\% \right]$$

Keterangan :

$X_p$  = Parasitemia perlakuan

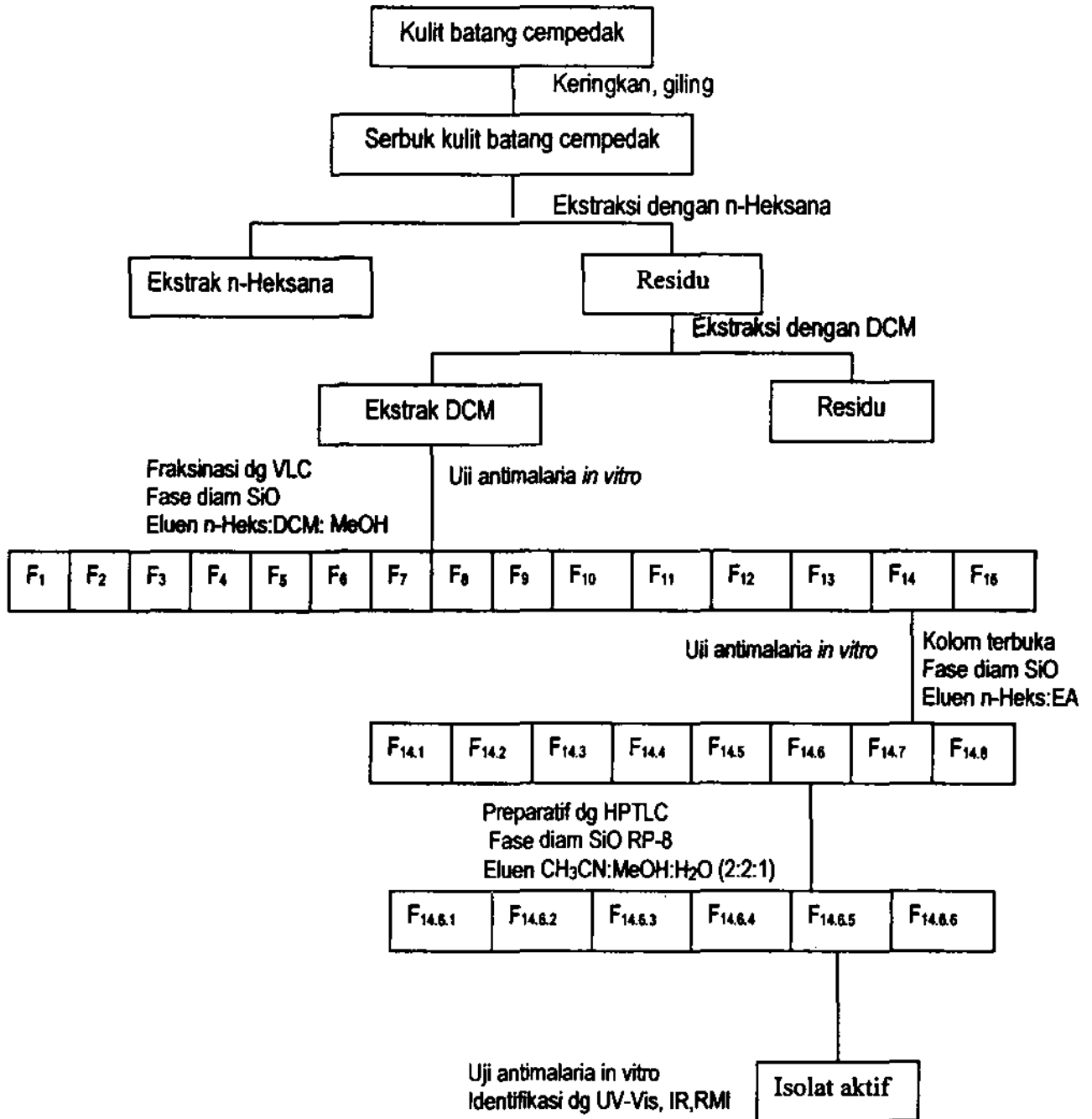
$X_k$  = Parasitemia kontrol

#### 4.4.6 Analisis Data

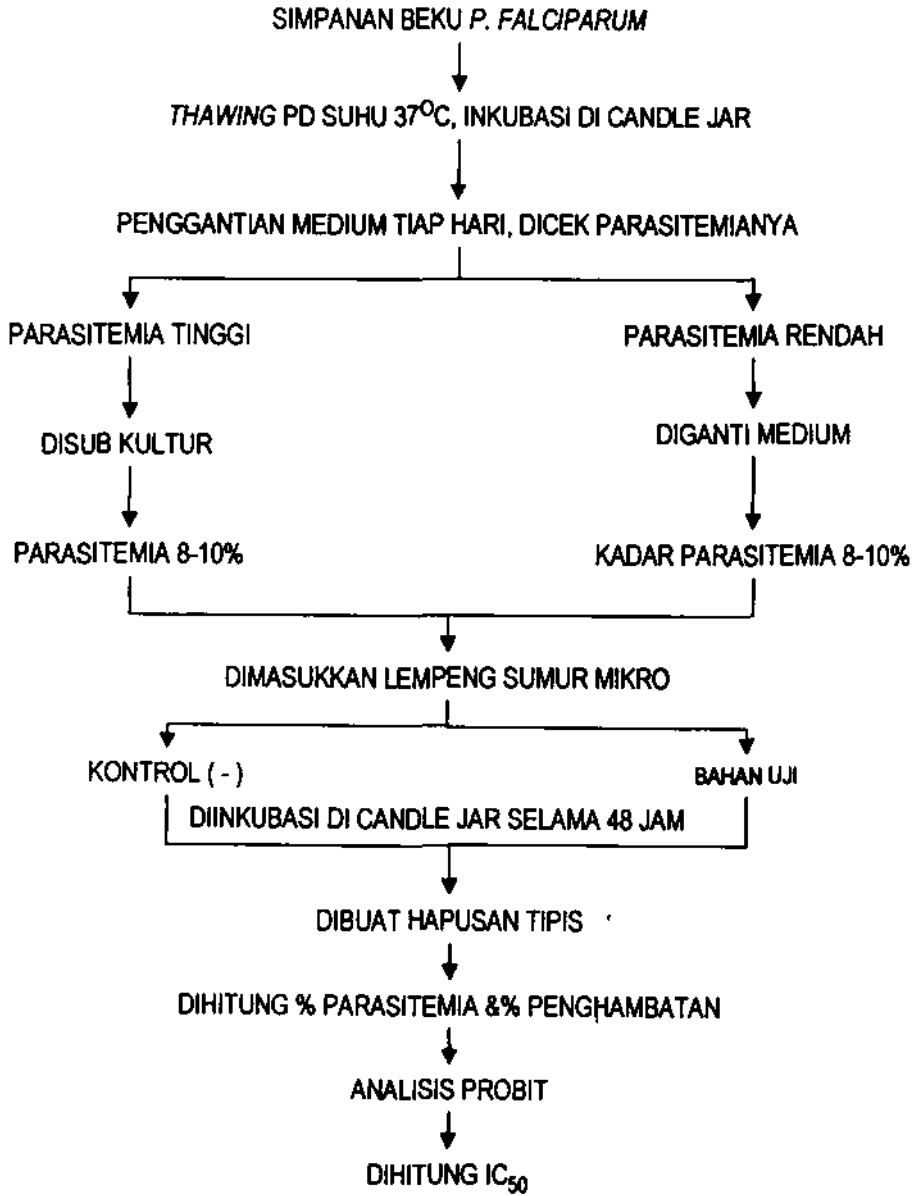
$IC_{50}$  adalah kadar dimana persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* sebesar 50%. Untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  digunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (*probability unit*) prosentase penghambatan dengan logarirma kadar menggunakan persamaan garis regresi linier.



Skema metode penelitian sebagai berikut :



Gambar 4.1 Skema metode penelitian

**SKEMA UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA SECARA *IN VITRO***Gambar 4.2 Skema uji aktivitas antimalaria secara *in vitro*

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil Ekstraksi dan Isolasi Kulit Batang *A. champeden*

Sebanyak 750 gram serbuk kulit batang *A. champeden* diekstraksi dengan n-heksana menghasilkan ekstrak n-heksana 5,9 gram. Residu dikeringkan kemudian diekstraksi kembali dengan diklorometana menghasilkan 6,6 gram ekstrak diklorometana. Terhadap 4 gram ekstrak diklorometana dilakukan kromatografi kolom vakum dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak berturut-turut n-heksana, n-heksana-diklorometana, diklorometana, diklorometana-metanol dan terakhir methanol menghasilkan 15 fraksi.

Kromatogram fraksi 1 – 15 hasil pemisahan ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* dapat dilihat pada gambar 5.1 berikut ini



Gambar 5.1 Kromatogram fraksi 1 – 15 ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* yang dilarutkan diklorometana, menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana : etilasetat (3 : 1) dan penampak noda uap amonia

Pada kromatogram gambar 5.1 dapat diamati adanya noda-noda berwarna kuning mulai fraksi 7 – 15. Noda-noda berwarna kuning tersebut menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Uji aktivitas antimalaria fraksi 4 – 15 yang dilakukan oleh Qurniawati (2005) menunjukkan fraksi 14 memiliki aktivitas yang paling tinggi (lampiran 5). Berdasarkan aktivitas antimalaria dan berat fraksi maka dipilih fraksi 14 (985 mg) untuk diisolasi lebih lanjut. Terhadap fraksi 14 dilakukan kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak heksan-etilasetat menghasilkan 8 subfraksi. Terhadap subfraksi 6 dilakukan kromatografi lapis tipis preparatif dengan fase diam silika gel RP-8 dan fase gerak asetonitril : methanol : air (2 : 1 : 1) menghasilkan isolat seberat 1,1 mg. Selanjutnya dilakukan isolasi kembali terhadap 12 gram ekstrak diklorometana menghasilkan 4 mg isolat.

## **5.2 Hasil Analisis dan Identifikasi secara Kromatografi dan Spektroskopi**

### **5.2.1 Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis**

Ekstrak, fraksi 14 dan isolat kulit batang *A. champeden* diamati dengan kromatografi lapis tipis menggunakan :

- fase diam : silika gel RP-18
- fase gerak : asetonitril : methanol : air (2 : 2 : 1)
- penampak noda : pereaksi CeSO<sub>4</sub>

Hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.2 berikut ini

Gambar 5.2 Kromatogram ekstrak, fraksi 14 dan isolat kulit batang *A. champeden* yang dilarutkan diklorometana, menggunakan fase diam silika gel RP-18, fase gerak asetonitril : methanol : air (2 : 2 : 1) dengan penampak noda  $\text{CeSO}_4$  1% dalam Asam Sulfat 10%

Keterangan gambar :

- E : ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden*
- F 14 : fraksi 14 kulit batang *A. champeden*
- I : Isolat kulit batang *A. champeden*

Pada gambar 5.2 di atas dapat diamati adanya noda berwarna jingga pada  $R_f$  0,57 baik pada ekstrak diklorometana, fraksi 14 maupun isolate I. Noda berwarna jingga tersebut kemungkinan senyawa flavonoid.

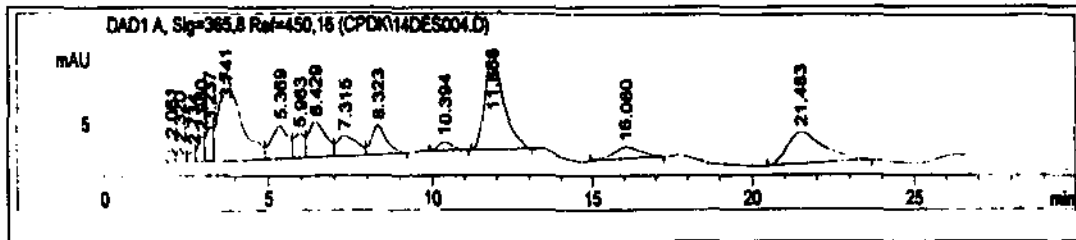
Nilai  $R_f$  hasil kromatografi lapis tipis ekstrak diklorometana, fraksi 14 dan isolat kulit batang *A. champeden* menggunakan pereaksi penampak noda  $\text{CeSO}_4$  dan sinar  $\text{UV}_{365}$  dapat dilihat pada tabel 5.1 di bawah ini.

Tabel 5.1 Hasil KLT ekstrak diklorometana, fraksi 14 dan isolat kulit batang *A. champeden* yang dilarutkan diklorometana, menggunakan fase diam silika gel RP-18, fase gerak asetonitril : methanol : air (2 : 2 : 1) dengan penampak noda  $\text{CeSO}_4$  1% dalam Asam Sulfat 10%

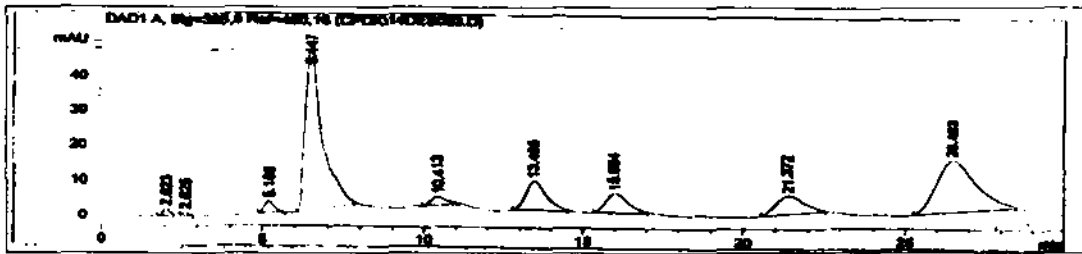
Bahan	Nilai $R_f$	Warna dengan $\text{CeSO}_4$	Noda pada $\text{UV}_{365}$
Ekstrak diklorometana kulit batang <i>A. champeden</i>	0,66	Jingga	Terdapat beberapa noda
	0,57	Jingga	
	0,43	Jingga	
	0,28	Jingga	
Fraksi 14	0,66	Jingga	Terdapat beberapa noda
	0,57	Jingga	
	0,43	Jingga	
Isolat	0,57	Jingga	Biru tua
	0,56	-	Kuning

### 5.2.2 Analisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

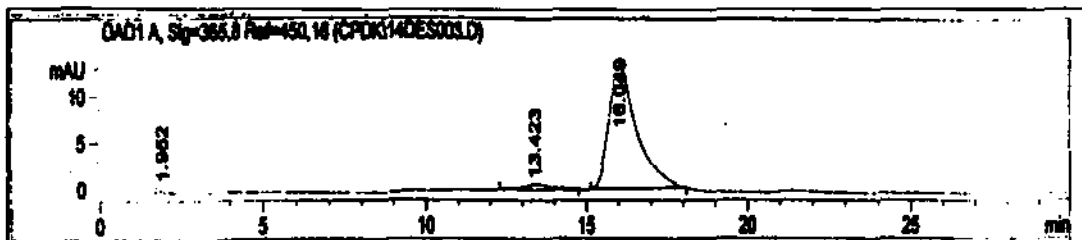
Profil kromatogram ekstrak diklorometana, fraksi 14 dan isolat kulit batang *A. champeden* hasil KCKT menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dieluasi selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada  $\lambda$  365 nm, dapat dilihat pada kromatogram di bawah ini



Gambar 5.3 Profil kromatogram KCKT ekstrak diklorometana kulit batang *A. Champeden* yang dilarutkan asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$ , menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dieluasi selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada  $\lambda$  365 nm.



Gambar 5.4 Profil kromatogram KCKT fraksi 14 kulit batang *A. Champeden* yang dilarutkan asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dengan konsentrasi 500 µg/ml menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dieluasi selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada λ 365 nm.



Gambar 5.5. Profil kromatogram KCKT isolat I kulit batang *A. Champeden* yang dilarutkan asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dengan konsentrasi 500 µg/ml menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dieluasi selama 30 menit, kecepatan 1 ml/menit, dideteksi pada λ 365 nm.

### 5.2.3 Identifikasi Isolat

#### 5.2.3.1 Identifikasi dengan KLT

Identifikasi isolat I kulit batang *A. champeden* dengan beberapa macam fase diam dan fase gerak menggunakan penampak noda uap amonia dapat dilihat pada gambar 5.6

:

A.                      B.                      C.

Gambar 5.6 Kromatogram isolat kulit batang *A. Champeden* yang dilarutkan diklorometana (A) fase diam silika gel GF<sub>254</sub> fase gerak kloroform:metanol (98:2), (B) fase diam silika gel GF<sub>254</sub> fase gerak n-heksana:etilasetat (1:1), (C) fase diam silika gel RP-8 fase gerak asetonitril:metanol:air (2:2:1)

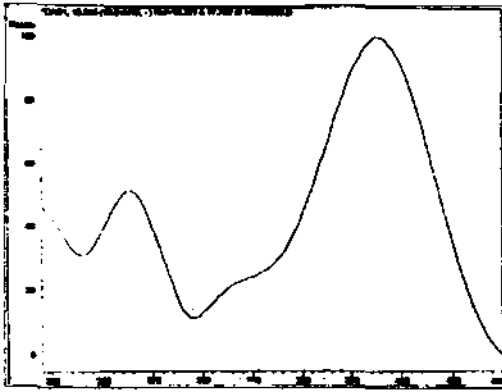
Dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana : etilasetat (1 : 1) diperoleh noda tunggal berwarna kuning intensif pada  $R_f$  0,17. Dengan fase diam silika gel RP-8 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (2 : 2 : 1) diperoleh noda tunggal berwarna kuning intensif pada  $R_f$  0,69. Sedangkan dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform : metanol (98 : 2) noda berwarna kuning intensif tidak naik.

### 5.2.3.2 Identifikasi dengan UV-Vis

#### 5.2.3.2.1 Identifikasi puncak-puncak pada kromatogram KCKT

Profil spektrum UV-Vis yang dimiliki oleh puncak-puncak pada kromatogram KCKT diamati. Puncak dengan  $R_t$  16 menit (yang paling dominan) memiliki spektrum UV-Vis seperti pada gambar 5.7 di bawah ini.

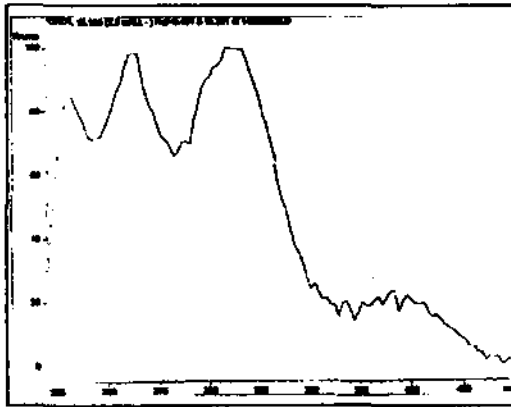




Gambar 5.7 Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada  $R_t$  16 menit, menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dideteksi dengan *Photo Diode Array*.

Spektrum UV-Vis di atas memiliki dua  $\lambda_{\max}$  yaitu 265 nm dan 387 nm. Spektrum tersebut identik dengan spektrum flavonoid.

Sedangkan spektrum UV-Vis yang dimiliki puncak dengan  $R_t$  13 menit dapat dilihat pada gambar 5.8 berikut ini

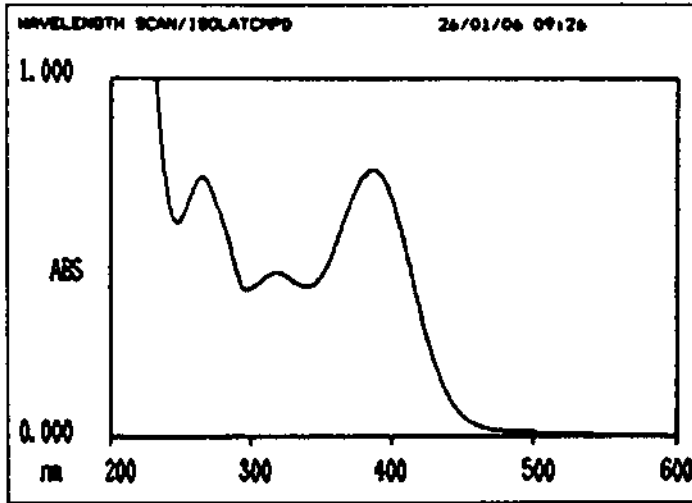


Gambar 5.8 Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada  $R_t$  13 menit, menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4), dideteksi dengan *Photo Diode Array*.

Spektra UV-Vis di atas juga memiliki dua  $\lambda_{\max}$  yaitu 265 nm dan 319 nm. Spektrum tersebut tidak identik dengan spektrum flavonoid.

### 5.2.3.2.2 Identifikasi dengan spektrometer UV-Vis

Identifikasi dengan spektrometer UV-Vis terhadap isolat I dan hasilnya dapat dilihat pada gambar di bawah ini

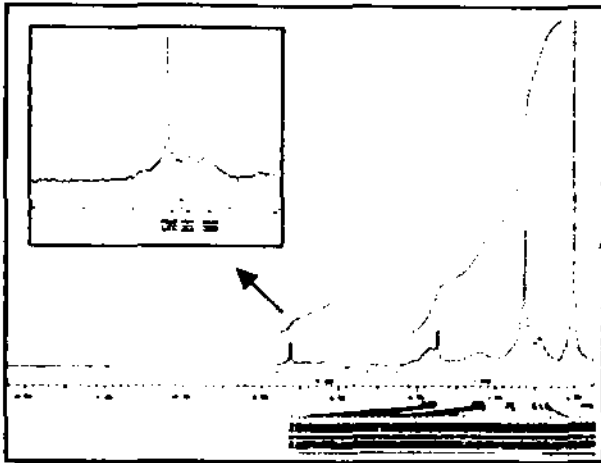


Gambar 5.9 Spektrum UV-Vis isolat I kulit batang *A. Champeden* yang dilarutkan metanol p.a, menggunakan spektrometer UV-Vis (Perkin Elmer Lambda EZ 201)

Pada spektrum UV-Vis isolat I di atas dapat diamati tiga  $\lambda_{\max}$  yaitu 265 nm, 319 nm dan 387 nm. Spektrum UV-Vis isolat I merupakan gabungan spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 13 menit dan puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 16 menit.

### 5.2.3.3 Identifikasi dengan Spektrometri Resonansi Magnetik Inti Proton

Spektrum RMI proton dengan pergeseran kimianya dapat dilihat pada gambar 5.10 di bawah ini

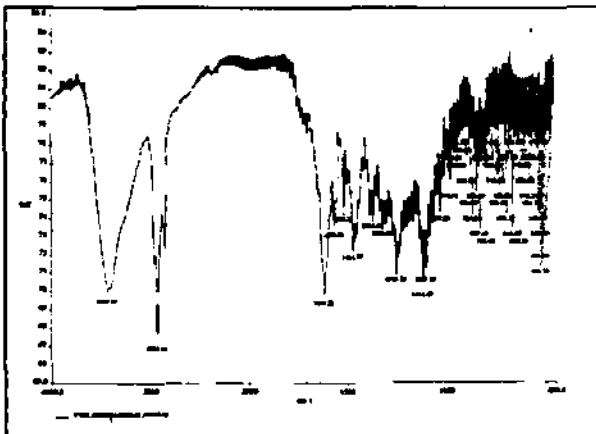


Gambar 5.10 Spektrum RMI proton isolat I kulit batang *A. Champeden* dilarutkan dalam  $\text{CDCl}_3$  dengan konsentrasi 4 mg isolat dalam 0,5 ml  $\text{CDCl}_3$  menggunakan Spektrometer FT-NMR (Hitachi R-1900) yang dioperasikan pada frekuensi 90 MHz.

Pada spektra RMI proton di atas dapat diamati adanya puncak-puncak pada geseran kimia ( $\delta$ ) 0,835 – 0,881 ppm; 1,257 ppm; 2,309 – 2,575 ppm; 3,485 ppm; 3,693 – 3,715 ppm; 6,346 – 6,451 ppm; 6,805 – 6,871 ppm dan 7,254 ppm.

#### 5.2.3.4 Identifikasi dengan Spektrometri Infra Merah

Spektrum infra merah isolat I dapat dilihat pada gambar 5.11 di bawah ini.



Gambar 5.11 Spektrum inframerah isolat I kulit batang *A. Champeden* yang dibuat pelet dengan KBr, menggunakan spektrometer FT-IR (Perkin Elmer)

Pada spektrum inframerah di atas dapat diamati adanya puncak-puncak serapan kuat pada bilangan gelombang  $3435\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923\text{ cm}^{-1}$  dan  $1614\text{ cm}^{-1}$ .

### 5.3 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria

Hasil pengamatan terhadap penghambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* dari ekstrak diklorometana, fraksi 14 dan isolat kulit batang *A. champeden* serta kloroquin difosfat sebagai pembanding dapat dilihat pada tabel 5.2 sampai 5.6 berikut ini.

Tabel 5.2 Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* oleh ekstrak diklorometana kulit batang *A. Champeden* dengan dosis 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100  $\mu\text{g/ml}$  setelah kultur *P. falciparum* diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali.

Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ )	Repl.	D0 (0 jam)		D2 (48 jam)		%Pertumb. <i>P. falc.</i>	%Hamb. Pertumb. <i>P. falc.</i>
		Erit. Inf.	%Parst	Erit. Inf	%Parst		
K (-)	1	45	0,90	316	6,32	5,42	0
	2	46	0,92	300	6,00	5,08	0
0,01	1	45	0,90	248	4,59	4,06	25,09
	2	46	0,92	277	5,54	4,62	9,06
0,1	1	45	0,90	248	4,96	4,06	25,09
	2	46	0,92	234	4,68	3,76	25,98
1	1	45	0,90	226	4,52	3,62	33,21
	2	46	0,92	171	3,42	2,50	50,79
10	1	45	0,90	159	3,18	2,28	57,93
	2	46	0,92	117	2,34	1,42	72,04
100	1	45	0,90	8	0,16	0,00	100,00
	2	46	0,92	16	0,32	0,00	100,00

Tabel 5.3 Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* oleh fraksi 14 dengan dosis 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 µg/ml setelah kultur *P. falciparum* diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali.

Dosis (µg/ml)	Repl.	D0 (0 jam)		D2 (48 jam)		%Pertumb. <i>P. falc.</i>	%Hamb. Pertumb. <i>P. falc.</i>
		Erit. Inf.	%Parst	Erit. Inf	%Parst		
K (-)	1	43	0,86	337	6,74	5,88	0
	2	52	1,04	340	6,80	5,76	0
0,01	1	43	0,86	270	5,40	4,54	22,79
	2	52	1,04	279	5,58	4,54	21,18
0,1	1	43	0,86	232	4,64	3,78	35,71
	2	52	1,04	222	4,44	3,40	40,97
1	1	43	0,86	147	2,94	2,08	64,62
	2	52	1,04	171	3,42	2,38	58,68
10	1	43	0,86	53	1,06	0,20	96,60
	2	52	1,04	78	1,56	0,52	90,97
100	1	43	0,86	0	0	0	100,00
	2	52	1,04	0	0	0	100,00

Tabel 5.4 Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* oleh isolat I kulit batang *A. champeden* dengan dosis 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 dan 10 µg/ml setelah kultur *P. falciparum* diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali.

Dosis (µg/ml)	Repl.	D0 (0 jam)		D2 (48 jam)		%Pertumb. <i>P. falc.</i>	%Hamb. Pertumb. <i>P. falc.</i>
		Erit. Inf.	%Parst	Erit. Inf	%Parst		
K (-)	1	42	0,84	442	8,84	8,00	0
	2	48	0,96	485	9,16	8,20	0
0,0001	1	42	0,84	354	7,08	6,24	22,00
	2	48	0,96	333	6,66	5,70	30,49
0,001	1	42	0,84	302	6,04	5,20	35,00
	2	48	0,96	315	6,30	5,34	34,90
0,01	1	42	0,84	294	5,88	5,04	37,00
	2	48	0,96	267	5,34	4,38	46,58
0,1	1	42	0,84	236	4,72	3,88	51,50
	2	48	0,96	223	4,46	3,50	57,32
1	1	42	0,84	183	3,66	2,82	64,75
	2	48	0,96	167	3,34	2,38	70,98
K (-)	1	43	0,86	377	7,54	6,68	0
	2	52	1,04	354	7,08	6,04	0
10	1	43	0,86	90	1,80	0,94	85,93
	2	52	1,04	103	2,06	1,02	83,11

Tabel 5.5 Jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 5000 eritrosit dan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* oleh kloroquin dengan dosis 0,001; 0,01; 0,1; 1 dan 10 µg/ml setelah kultur *P. falciparum* diinkubasi 48 jam, dilihat pada hapusan darah tipis di bawah mikroskop, diperbesar 1000 kali.

Dosis (µg/ml)	Repl.	D0 (0 jam)		D2 (48 jam)		%Pertumb. <i>P. falc.</i>	%Hamb. Pertumb. <i>P. falc</i>
		Erit. Inf.	%Parst	Erit. Inf	%Parst		
K (-)	1	42	0,84	131	2,62	1,78	0
	2	46	0,92	125	2,50	1,58	0
0,001	1	42	0,84	86	1,72	0,88	50,56
	2	46	0,92	88	1,76	0,84	46,84
0,01	1	42	0,84	77	1,54	0,70	60,67
	2	46	0,92	87	1,74	0,82	48,10
0,1	1	42	0,84	73	1,46	0,62	65,17
	2	46	0,92	66	1,32	0,40	74,68
1	1	42	0,84	60	1,20	0,36	79,78
	2	46	0,92	56	1,12	0,20	87,34
10	1	42	0,84	9	0,18	0	100,00
	2	46	0,92	5	0,10	0	100,00

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian tentang aktivitas antimalaria tanaman *A. champeden* telah dilakukan. Dhani dan kawan-kawan (2003) meneliti aktivitas antimalaria ekstrak metanol kulit batang *A. champeden* secara *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* dan mendapatkan hasil  $IC_{50}$  6,95 mg/kg BB. Widyawaruyanti (2004) meneliti aktivitas antimalaria ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* secara *in vivo* dan mendapatkan hasil  $IC_{50}$  1,40324 mg/kg BB serta secara *in vitro* pada *P. falciparum* dan mendapatkan  $IC_{50}$  4,86043  $\mu$ g/ml. Dari kedua penelitian aktivitas antimalaria secara *in vivo* di atas dapat dilihat bahwa ekstrak diklorometana memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih kecil dibandingkan ekstrak metanol.

Penelitian mengenai kandungan *A. champeden* menunjukkan bahwa senyawa golongan flavonoid merupakan kandungan yang paling dominan (Achmad, 2004). Senyawa flavonoid bebas adalah senyawa yang bersifat semi polar, dan diklorometana merupakan pelarut pengestraksi bagi senyawa yang bersifat semipolar sehingga ada kemungkinan senyawa flavonoid inilah yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antimalaria. Oleh sebab itu pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa flavonoid kulit batang *A. champeden* dan pada setiap tahapan isolasi dilakukan uji aktivitas antimalaria.

Proses ekstraksi kulit batang *A. Champeden* untuk mendapatkan kandungan senyawa yang bersifat semi polar mengacu kepada prosedur yang telah dilakukan



oleh Achmad dan kawan-kawan (1996) dengan suatu modifikasi. Mula-mula serbuk kulit batang *A. Champeden* dimaserasi menggunakan n-heksana dengan tujuan untuk menghilangkan lemak. Setelah ekstraksi dengan n-heksana selesai residu dikeringkan kembali. Selanjutnya kalau pada prosedur yang dilakukan oleh Achmad residu yang telah kering diekstraksi dengan pelarut polar (metanol) baru kemudian dipartisi ke pelarut semi polar, maka pada penelitian ini residu kering langsung diekstraksi dengan pelarut semi polar dalam hal ini menggunakan pelarut diklorometana. Dengan cara seperti ini dapat mempersingkat proses ekstraksi. Ekstrak diklorometana kemudian diuapkan dengan rotavapour sampai pekat. Kemudian dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel RP 18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (2 : 2 : 1). Hasil KLT dengan penampak noda seri sulfat memberikan noda berwarna jingga dengan  $R_f$  0,57; 0,43 dan 0,28 dan berwarna kuning kehijauan pada  $R_f$  0,66.

Selanjutnya ekstrak diklorometana dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum dan dihasilkan 15 fraksi. Uji aktivitas antimalaria fraksi 4-15 yang dilakukan oleh Qurniawati (2005), masing-masing dengan dosis 100  $\mu\text{g/ml}$ , menggunakan kultur *P. falciparum* strain G2300 menunjukkan bahwa fraksi 14 memiliki aktivitas paling tinggi (menghambat 100% pertumbuhan *P. falciparum*). Uji aktivitas antimalaria terhadap fraksi 14 menggunakan kultur *P. falciparum* strain 3D7 ternyata menunjukkan hasil yang sama yakni pada dosis 100  $\mu\text{g/ml}$  mampu menghambat 100% pertumbuhan *P. falciparum*. Berdasarkan pertimbangan aktivitas antimalaria dan jumlah bahan (fraksi 14 seberat 985 mg) maka fraksi 14 yang dilanjutkan proses

isolasinya. Pada uji kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel RP 18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (2 : 2 : 1) serta penampak noda seri sulfat, fraksi 14 memberikan noda berwarna jingga dengan  $R_f$  0,57 dan 0,43 dan berwarna kuning kehijauan pada  $R_f$  0,66.

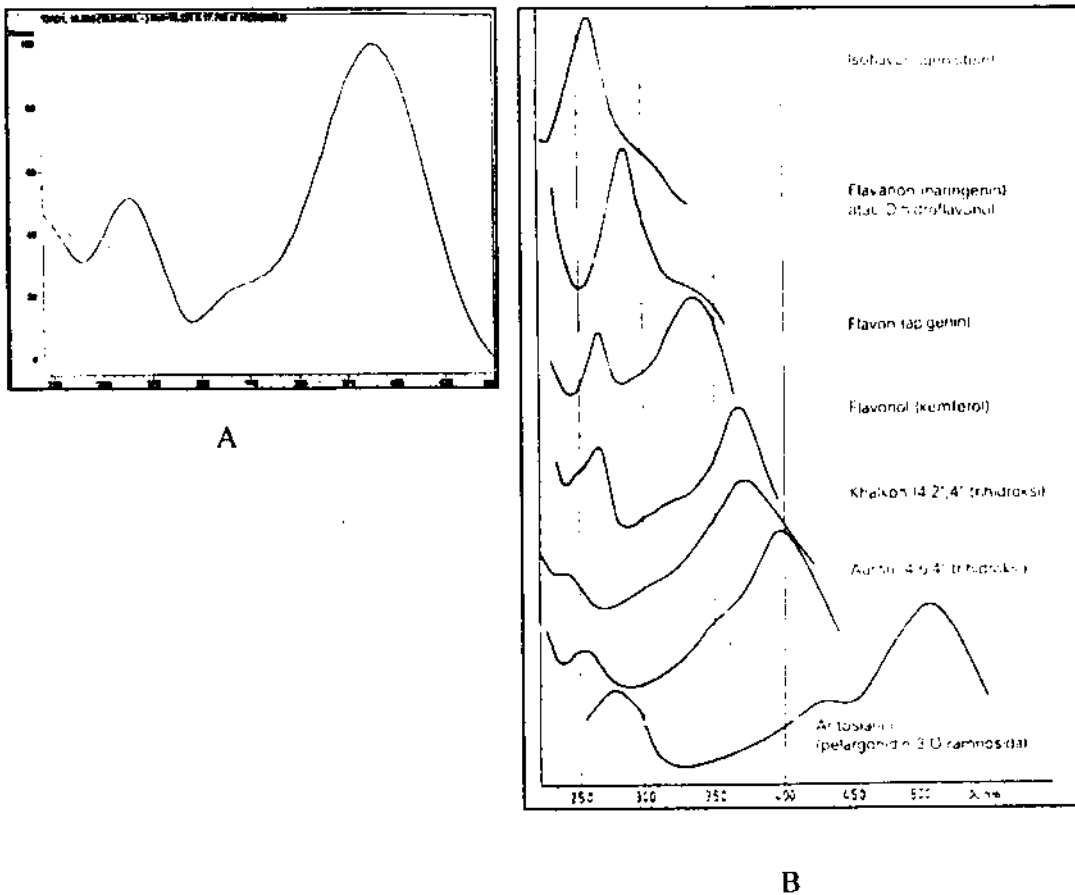
Fraksi 14 dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak heksan-etilasetat mulai perbandingan 2:1 sampai 0:1 menghasilkan 8 subfraksi yaitu subfraksi 14.1 – 14.8. Terhadap subfraksi 14.6, yang pada KLT menunjukkan noda jingga pada  $R_f$  0,57, dilakukan KLT preparatif dengan fase diam silika gel RP 8 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (2 : 1 : 1) menghasilkan isolat I sebanyak 1,1 mg.

Selanjutnya terhadap isolat I dilakukan uji KLT dengan berbagai macam fase gerak menggunakan penampak noda uap amonia yang menghasilkan noda berwarna kuning intensif. Ini menunjukkan bahwa isolat I tersebut adalah senyawa flavonoid. Dengan fase diam silika gel RP 8 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (2 : 2 : 1) terdapat noda tunggal berwarna kuning intensif pada  $R_f$  0,69. Dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana : etilasetat (1 : 1) terdapat noda tunggal terdapat noda tunggal berwarna kuning intensif pada  $R_f$  0,17. Sedangkan dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform : metanol (98 : 2) noda berwarna kuning intensif tidak naik. Dari hasil uji KLT yang menampakkan satu noda dengan berbagai fase diam dan fase gerak, dapat dikatakan isolat I mengandung senyawa flavonoid. Kemudian dilakukan uji dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang daya pisahnya lebih baik dibandingkan KLT (Mulya dan Suharman, 1995).

KCKT disamping dilakukan terhadap isolat I juga dilakukan terhadap ekstrak diklorometana dan fraksi 14 untuk mengetahui profil kromatogramnya. Pada analisis dengan KCKT ini kolom silika gel RP-18 dan eluen asetonitril:metanol:air (3:3:4). Pada kromatogram KCKT isolat I menunjukkan satu puncak dominan pada  $R_t$  16 menit disamping puncak-puncak lainnya. Adanya puncak-puncak ini menandakan bahwa masih ada senyawa lain disamping senyawa yang dimaksud, meskipun secara KLT menunjukkan satu noda.

KCKT yang dipergunakan memakai detektor *Photo Diode Array* yang memiliki rentang pengukuran 190 – 600 nm. Detektor ini disamping bisa digunakan untuk melihat profil kromatogram juga bisa untuk melihat spektrum UV-Vis masing-masing puncak pada kromatogram. Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada  $R_t$  16 menit menunjukkan adanya dua panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\max}$ ) yaitu pada 265 nm dan 387 nm. Profil spektrum ini sesuai dengan profil spektrum UV-Vis flavonol maupun flavon.  $\lambda$  265 nm berkaitan dengan absorpsi oleh sistem cincin sinamoil (pita II), sedangkan  $\lambda$  387 nm berkaitan dengan absorpsi oleh sistem cincin benzoil (pita I) pada senyawa flavonoid (Marby dkk., 1970). Pada senyawa flavon, atom  $C_3$  tidak memiliki gugus OH, sedangkan pada senyawa flavonol terdapat OH (baik bebas maupun tersubstitusi) pada atom  $C_3$ . Secara teoritis OH pada  $C_3$  memberikan sumbangan 35 nm terhadap  $\lambda_{\max}$  flavonoid. Jadi, jika tidak ada OH pada  $C_3$  maka  $\lambda_{\max}$  flavonoid akan berkurang 35 nm. Jika pada atom  $C_3$  terdapat substituen isopren, sumbangan ikatan rangkap isopren hanya 5 nm tiap ikatan

rangkap (Mulya dan Suharman, 1995). Menurut Markham (1985), flavonol memiliki dua  $\lambda_{\max}$  yaitu antara 250 – 280 nm dan antara 350 – 385 nm, sedangkan flavon memiliki  $\lambda_{\max}$  antara 250 – 280 nm dan antara 310 -350 nm sebagaimana terlihat pada gambar 6.1 di bawah ini. Jadi profil spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 16 menit identik dengan flavonol.



**Gambar 6.1** Identifikasi spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada *Rt* 16 menit menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) (A) dengan berbagai senyawa flavonoid (B) yang dikutip dari Markham (1985)

Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada  $R_t$  13 menit juga menunjukkan adanya dua  $\lambda_{\max}$  yaitu pada  $\lambda$  265 nm dan 319 nm. Profil spektrum UV-Vis puncak ini tidak identik dengan profil senyawa-senyawa flavonoid pada gambar 6.1. Beberapa senyawa flavonol alami memiliki profil spektrum UV-Vis (lampiran 15) yang mirip dengan profil spektrum UV-Vis flavonol yang digambarkan Markham pada gambar 6.1 di atas. Senyawa dominan dalam isolat I juga memiliki profil spektrum UV-Vis yang mirip dengan senyawa-senyawa flavonol alami tersebut. Hal ini menguatkan dugaan bahwa senyawa dominan dalam isolat I adalah senyawa flavonol.

Untuk memperkirakan pola hidroksilasi senyawa flavonoid di atas dapat digunakan berbagai pereaksi geser seperti natrium metoksida, natrium asetat dan aluminium klorida (Marby, 1970; Markham, 1985). Namun pada penelitian ini tidak dilakukan karena adanya pengotor yang dapat mengganggu interpretasi pola hidroksilasi senyawa flavonol.

Pengamatan spektrum UV-Vis isolat I yang dilarutkan metanol dengan spektrometer UV-Vis menunjukkan adanya tiga  $\lambda_{\max}$  yaitu 265 nm, 319 nm dan 387 nm.  $\lambda_{\max}$  265 nm di sini intensitasnya terlihat lebih tinggi dibandingkan yang dimiliki oleh puncak dengan  $R_t$  16 menit pada kromatogram KCKT.  $\lambda_{\max}$  265 nm di sini tidak hanya ditimbulkan oleh puncak dengan  $R_t$  16 menit, tetapi juga oleh puncak dengan  $R_t$  13 menit yang sama-sama memiliki  $\lambda_{\max}$  pada 265 nm.  $\lambda_{\max}$  319 nm

ditimbulkan oleh puncak dengan  $R_t$  13 menit, sedangkan  $\lambda_{\max}$  387 nm ditimbulkan oleh puncak dengan  $R_t$  16 menit.

Untuk menguatkan dugaan bahwa isolat I mengandung senyawa flavonol, dilakukan identifikasi dengan spektrometer inframerah. Dari spektrum inframerah dapat diamati adanya puncak yang kuat pada bilangan gelombang  $3435\text{ cm}^{-1}$ . Ini menunjukkan adanya vibrasi ikatan O-H. Vibrasi ikatan O-H terjadi pada rentang bilangan gelombang  $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ . Pada bilangan gelombang  $1614\text{ cm}^{-1}$  juga muncul puncak yang menandakan adanya vibrasi ikatan C=O (Silverstein, 1998; Spectral Data Base System, 2005). Adanya ikatan O-H dan C=O semakin menguatkan dugaan bahwa isolat I mengandung senyawa flavonol. Senyawa flavonol pada strukturnya terdapat gugus hidroksil (OH) dan karbonil (C=O).

Selanjutnya isolat I diidentifikasi dengan menggunakan spektrometer resonansi magnetik inti. Hasilnya menunjukkan adanya dua puncak singlet pada geseran kimia ( $\delta$ ) 6,346-6,451 dan 6,805-6,871. Puncak-puncak ini menandakan adanya proton aril Ar-H. Pada spektrum resonansi magnetik inti, puncak dengan  $\delta$  1,257 menunjukkan adanya proton R-CH<sub>2</sub>, demikian juga puncak pada  $\delta$  3,485. Menurut Hakim (1998) puncak-puncak  $\delta$  1,38 ; 1,57 ; 3,09 dan 5,09 merupakan ciri khas untuk gugus prenil. Oleh sebab itu ada kemungkinan senyawa flavonoid di sini juga memiliki gugus prenil.

Berdasarkan hasil identifikasi KLT dengan penampak noda uap amonia, spektra UV-Vis, inframerah dan resonansi magnetik inti dapat disimpulkan bahwa isolat I tersebut mengandung senyawa utama flavonoid jenis flavonol.

Selanjutnya berbasarkan adanya dugaan bahwa dalam ekstrak diklorometana kulit batang *A. Champeden* mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria, maka terhadap ekstrak, fraksi 14 dan isolat I dilakukan uji aktivitas antimalaria. Pada uji ini digunakan *P. falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap kloroquin.

Untuk melarutkan bahan uji, baik ekstrak, fraksi 14 maupun isolat I digunakan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO) yang pada volume akhir memiliki konsentrasi 0,5%. Pada batas konsentrasi ini, DMSO tidak mempengaruhi pertumbuhan parasit. Untuk membandingkan potensi bahan uji terhadap *P. falciparum*, dilakukan juga uji terhadap obat antimalaria yang sudah jelas potensinya yaitu kloroquin yang sampai saat ini masih digunakan secara luas. Pada uji aktivitas antimalaria ini hendak dilihat potensi penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* secara umum, artinya tidak dilihat penghambatan pada fase tertentu. Oleh sebab itu tidak dilakukan proses sinkronisasi.

Hambatan terhadap pertumbuhan parasit dapat diketahui dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit setiap 5000 eritrosit di bawah mikroskop pada hapusan darah tipis yang telah diwarnai dengan giemsa 20%. Untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  dari masing-masing bahan uji dihitung dengan memakai analisis probit. Nilai  $IC_{50}$  ini menunjukkan besarnya konsentrasi masing-masing bahan uji yang dapat menghambat 50% pertumbuhan parasit. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka semakin poten suatu bahan untuk menghambat pertumbuhan parasit.

Dari perhitungan hasil uji antimalaria diperoleh nilai  $IC_{50}$  masing-masing bahan uji sebagai berikut

- ekstrak kulit batang *A. champeden* :  $0,974 \pm 0,181 \mu\text{g/ml}$
- fraksi 14 :  $0,189 \pm 0,016 \mu\text{g/ml}$
- isolat I :  $0,024 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$
- kloroquin difosfat :  $0.003 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$

Kohler dkk. (2002) menyebutkan bahwa ekstrak yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari  $50 \mu\text{g/ml}$  dan fraksi yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari  $25 \mu\text{g/ml}$  dapat dikatakan aktif sebagai antimalaria. Dari data di atas dapat dilihat bahwa nilai  $IC_{50}$  ekstrak diklorometana dan fraksi 14 jauh di bawah  $50 \mu\text{g/ml}$  dan  $25 \mu\text{g/ml}$ . Oleh sebab itu ekstrak dan fraksi tersebut memang potensial untuk diisolasi lebih lanjut.

Menurut Fidock dkk., suatu senyawa dianggap memiliki aktivitas antimalaria jika memiliki  $IC_{50}$  kurang dari  $1 \mu\text{M}$ . Senyawa flavonol memiliki berat molekul 238 maka  $1 \mu\text{M}$  setara dengan  $0,238 \mu\text{g/ml}$ . Pada penelitian ini isolat I memiliki  $IC_{50}$   $0,024 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$ , yaitu 1/10 kali lebih rendah dari batasan tersebut, maka isolat I efektif sebagai antimalaria.

Dari berbagai kandungan yang terdapat dalam *A. champeden*, senyawa flavonoid diketahui memiliki berbagai aktivitas. Beberapa senyawa flavonoid yang terdapat dalam *A. champeden* memiliki potensi sebagai antimalaria (Zaini dkk., 2005). Oleh sebab itu diyakini senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria di dalam isolat I adalah flavonoid yang merupakan senyawa dominan dalam isolat tersebut.



Dengan keyakinan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak diklorometana memiliki aktivitas antimalaria maka tentunya harga  $IC_{50}$  semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi senyawa tersebut. Dapat dilihat nilai  $IC_{50}$  semakin menurun mulai dari ekstrak diklorometana, fraksi 14 sampai dengan Isolat I. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin aktif sebagai antimalaria.

Meskipun isolat I memiliki aktivitas antimalaria lebih rendah dibandingkan kloroquin difosfat, bukan berarti isolat tersebut tidak memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria. Seperti telah disebutkan di atas, dari analisis secara kromatografi dan spektroskopi dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dominan pada isolat I adalah senyawa golongan flavonoid. Struktur kimia flavonoid berbeda dengan obat-obat antimalaria yang ada saat ini, seperti alkaloid, seskuiterpen lakton dan golongan sulfa. Obat-obat dengan struktur kimia yang berbeda, sangat mungkin memiliki mekanisme kerja yang berbeda.

Dari berbagai literatur, ada beberapa kemungkinan mekanisme kerja flavonoid terhadap parasit malaria. Kemungkinan-kemungkinan mekanisme kerja ini ada yang memiliki target di vakuola makanan, yang lainnya di luar vakuola makanan.

Khalkon, suatu senyawa flavonoid minor telah diketahui memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan parasit melalui mekanisme penghambatan enzim sistein protease pada parasit. Hambatan terhadap sistein protease ini dapat menyebabkan terhambatnya proses hidrolisis hemoglobin menjadi asam amino yang dibutuhkan parasit. Dengan demikian sintesis protein parasit juga akan terhambat (Biagini, 2003).

Cyclochampedol, suatu senyawa flavonoid terisoprenilasi yang diperoleh dari *Artocarpus champeden*, dapat menghambat transportasi asam amino leusin melalui membran usus ulat sutera *Bombyx mori* (Parenti, 1998). Dengan demikian ada kemungkinan bahwa senyawa tersebut juga dapat menghambat transportasi asam-asam amino melewati membran vakuola makanan parasit.

Floridsin, suatu senyawa khalkon, memiliki aktivitas antimalaria karena menghambat permeabilitas eritrosit terhadap parasit. Hal ini menyebabkan hambatan masuknya parasit ke dalam eritrosit. Kuersetin, suatu senyawa flavonoid yang diisolasi dari *Diosma pilosa* ternyata menunjukkan aktivitas antimalaria yang kuat. Kuersetin mempunyai efek antimitokondria pada *Plasmodium* (Masroero dan Sutaryo, 1994).

Weenen dkk. (1990) mengisolasi tiga senyawa  $\alpha$ -cyperon, N-isobutil-2,4-dienamid dan securinin masing-masing berasal dari tanaman *Cyperus rotundus*, *Zathoxylum gilletii* dan *Margaritaria discoidea*. Ketiga senyawa tersebut memiliki aktivitas antimalaria. Hal yang menarik, pada struktur kimia masing-masing senyawa terdapat gugus karbonil tak jenuh- $\alpha,\beta$  yang mempunyai suatu ikatan rangkap karbon-karbon dan berkonjugasi dengan suatu gugus karbonil. Menurut Saxena dkk. (2003) gugus karbonil tak jenuh- $\alpha,\beta$  ini bereaksi molekul DNA parasit sehingga dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria. Sebagian besar flavonoid memiliki gugus karbonil tak jenuh- $\alpha,\beta$ . Oleh sebab itu ada kemungkinan flavonoid juga memiliki mekanisme kerja yang sama.

Dalam suatu kajian hubungan struktur aktivitas senyawa khalkon, dikatakan bahwa gugus karbonil tak jenuh- $\alpha,\beta$  penting bagi aktivitas antimalaria.

Ketidakberadaan gugus ini menyebabkan aktivitas turun paling sedikit 10 kali. Disamping itu disebutkan juga bahwa substitusi kloro atau fluoro pada cincin B dan substitusi pemberi elektron (seperti metoksi, imidazol dan lain-lain) pada cincin A memiliki aktivitas antimalaria lebih baik. Jika substituen cincin A ditukar dengan substituen cincin B maka aktivitas akan turun 5-10 kali (Li dkk., 1995).

Dari beberapa kemungkinan mekanisme yang disebut di atas, semuanya berbeda dengan mekanisme kerja obat-obat antimalaria yang sudah ada saat ini. Oleh sebab itu isolat I yang mengandung senyawa dominan flavonoid memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria dengan menentukan struktur dan mekanisme kerjanya.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat diambil kesimpulan :

1. Ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* , fraksi 14 dan isolat I menghambat pertumbuhan *P. falciparum* strain 3D7 dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing:
  - ekstrak diklorometana :  $0,974 \pm 0,181 \mu\text{g/ml}$
  - fraksi 14 :  $0,189 \pm 0,016 \mu\text{g/ml}$
  - isolat I :  $0,024 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$
2. Isolat I mengandung senyawa flavonoid jenis flavonol.

#### 7.2 Saran

Isolat I dengan nilai IC<sub>50</sub>  $0,024 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$  memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antimalaria. Oleh sebab itu disarankan

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji aktivitas antimalaria isolat I secara *in vivo*
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan struktur flavonol.
3. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan mekanisme kerja flavonol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A., 2004. Empat puluh tahun dalam kimia organik bahan alam tumbuhan-tumbuhan tropika Indonesia: rekoleksi dan prospek, **Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)** 2004. 4.35-454
- Achmad, S.A., et.al., 1996. A New Prenilated Flavon from *Artocarpus champeden*. **J. Nat. Prod** (59) 878-879.
- Agriana, R.H., Widyawaruyanti A., Ekasari W., (2003), Uji aktivitas antimalaria fraksi kloroform kulit batang cempedak (*Artocarpus champeden*) terhadap *Plasmodium berghei in-vivo*, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.
- Backer, C.A. and Backhuizen Van Den Brink, B.C., 1965. **Flora of Java Vol. II** Groningen The Netherland: NVP Noordhoff, p.19.
- Biagini, G.A., et. al., 2003. Antimalarial Chemoterapy: Young Guns or Back to The Future, **Trend in Parasitology**, Vol. 19, No. 11 : 479-487.
- Boonlaksiri C, et al. 2000. Antimalarial Stilbene from *Atocarpus integer*. **Phytochemistry Journal** 54: 415-417.
- Boyd, M.F., 1970. A Comprehensive survey of all aspect of the group of disease from a global sutand point. In **Malariology**, Vol. 1. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 29.
- Bruce, L., 1986. **Essential Malariology**. 2<sup>nd</sup> Edition, London: William Heinman Medical Books pp. 32-50.
- Depkes RI, 1987. **Analisis Obat Tradisional**. Jilid I, 43-52.
- Dhani, Nur W.U, Aty Widyawaruyanti dan Wiwied Ekasari, 2003. **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Methanol Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* SPRENG) terhadap *Plasmodium berghei in vivo***, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.
- Fessenden & Fessenden, 1986 (Terjemahan Pudjaatmaka). **Kimia Organik**. Edisi ke-3. Penerbit Erlangga Jakarta.
- Fidock, D.A., et. al. **Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening** (supplementary document).  
[\[http://www.mmv.org/IMG/pdf/SCREEN\\_PDF.pdf\]](http://www.mmv.org/IMG/pdf/SCREEN_PDF.pdf)

- Morton, J., 1987. **Fruit of Warm Climats**. Creative Resource Systems Inc. Miami, Florida.
- Mulya, M. dan Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**. Airlangga University Press. Hal 237.
- Mustofa, 2003. Molekul Antimalaria Alami : Potensi dan Tantangan Pengembangannya sebagai Obat Baru Malaria. **Majalah Obat Tradisional**. Vol 8 (26) : 8 – 17 (Edisi Khusus).
- Noster S. and Kraus L.J., 1990. Invitro antimalarial activity of *Cautarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extract on *Plasmodium falciparum*. **Planta Medica** 56 (1) : 63-65.
- Parenti, P., et. al., 1998. A new prenylated flavone from *Artocarpus champeden* inhibit the K(+)-dependent amino acid transport in *Bombyx mori* midgut. **Biochem Biophys. Res. Commun.** 244 (2) : 445-448
- Phillipson JD and Wright CW, 1991. Antiprotozoal agents plant sources. **Planta Medica** 57 (1) : 53-59
- Qurniawati, E. dkk., 2005. **Aktivitas Antimalaria Fraksi Hasil Pemisahan Ekstrak Diklorometana Kulit Batang *Artocarpus champeden* Spreng. terhadap Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* In Vitro**. Unpublish
- Robinson, T., 1983. **The Organic Constituens of Higher Plant** 5<sup>th</sup> Edition. Massachusetts. Cordus Press pp. 4-6
- Roth, J.H., Blascke G., 1988 (Terjemahan Sarjono K. dan Slamet I). **Analisis Farmasi**. Yogyakarta: gajah Mada University Press hal 424-426.
- Rudyanto, M., 2004. **Dasar Teori dan Aplikasi Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti**.
- Saxena, S., et al., 2003. Antimalarial Agent from Plant Source. **Current Science**. Vol. 84 (9) : 1314 –1326
- Schlesinger, P.H., Krogstad, D.J., Herwaldi, B.L., 1988. Antimalarial agent: mechanism of action. **J. Antimicrobial Agents an Chemotherapy**. June: 793-798.
- Silverstein, R.M. and Webster, F.X., 1998. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. John Wiley and Sons Inc. p 87.

- Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan. [<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> (diakses 6 Desember 2005)]
- Skoog, A., 1981. **Principle of Instrumental Analysis**. Japan: Holt Sounder International pp. 407-447, 523-565, 837-847.
- Sutisna, P., 2003. **Malaria secara Ringkas: dari Pengetahuan Dasar sampai Terapan**. EGC, Jakarta : 21 – 34.
- Trager, W. and Jensen, J.B., 1976. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. **Science** Vol. 19: 673-675.
- Weenan, H., et.al., 1990. Antimalarial Compounds Containing an  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Moiety from Tanzanian Medicinal Plants. **Planta Med.**, 56 : 371-373
- WHO, 1985. Special programe for research and training in tropical disease research. TDR seventh program report malaria (2). **WHO Spec. programe for trop. Disease**. Pp. 2-13
- Widyawaruyanti, A. dkk., 2004. **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Diklorometana dan Metanol Kulit Batang *Artocarpus champeden***. Unpublished.
- Zaini, N.C., Dachlan, Y.P. dan Syafrudin, 2004. **Potensi dan Mekanisme Aksi Senyawa Aktif Antimalaria**. Unpublished
- Ziegler H.L., et.al., 2004. The Antiparasitic Compound Licochalcone A Is a Potent Echinocytogenic Agent That Modifies the Erythrocyte Membrane in the Concentration Range Where Antiplasmodial Activity Is Observed. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol .48 No. 10, 4067-4071.

Lampiran 1 Tabel jumlah eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* (strain G2300) setiap 5000 eritrosit dan %hambatan pertumbuhan oleh fraksi 4 – 15 ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden*, masing-masing dengan dosis 100 µg/ml. Dikutip dari Qurniawati (2005)

Fraksi	Repl.	Eri. Inf.	%Parst.	Rata	%Hambt
K (-)	1	58	1,16	1,27	0,00
	2	69	1,38		
4	1	101	2,02	2,03	0,00
	2	102	2,04		
5	1	54	1,08	1,30	0,00
	2	76	1,52		
6	1	9	0,18	0,20	84,25
	2	11	0,22		
7	1	13	0,26	0,24	81,10
	2	11	0,22		
8	1	3	0,06	0,07	94,49
	2	4	0,08		
9	1	3	0,06	0,06	95,27
	2	3	0,06		
10	1	1	0,02	0,01	99,21
	2	0	0,00		
11	1	0	0,00	0,01	99,21
	2	1	0,02		
12	1	0	0,00	0,00	100,00
	2	0	0,00		
13	1	5	0,10	0,09	92,91
	2	4	0,08		
14	1	0	0,00	0,00	100,00
	2	0	0,00		
15	1	4	0,08	0,08	93,70
	2	4	0,08		



Lampiran 2 Analisis probit ekstrak diklorometana replikasi ke 1

EKATRAK-1 \* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 Parameter estimates converged after 9 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.53224	.04747	11.21128

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-.03337	.06186	-.53935

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 45.034    DF = 3    P  
 = .000

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

\* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

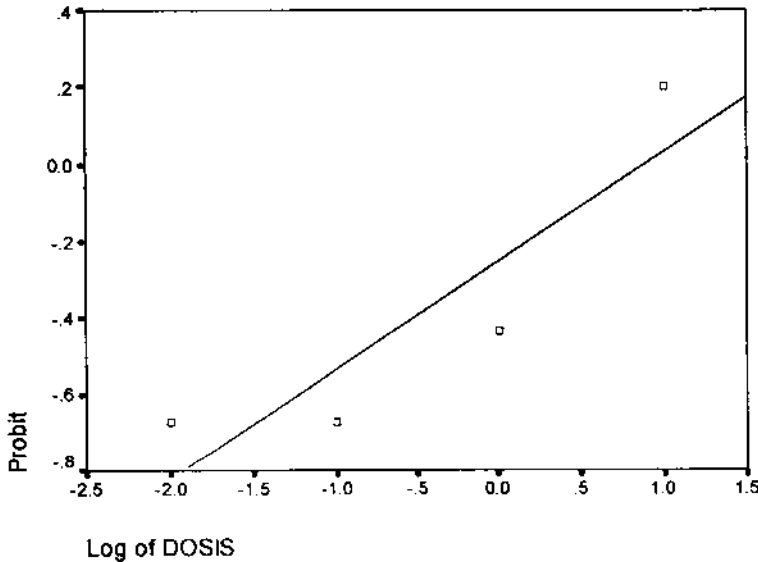
Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-2.00	100.0	25.1	13.613	11.477	.13613
-1.00	100.0	25.1	28.583	-3.493	.28583
.00	100.0	33.2	48.669	-15.459	.48669
1.00	100.0	57.9	69.107	-11.177	.69107
2.00	100.0	100.0	84.876	15.124	.84876

EKSTRAK-1 \* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \*  
 Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00005	.	.
.02	.00016	.	.
.03	.00034	.	.
.04	.00059	.	.
.05	.00094	.	.
.06	.00139	.	.
.07	.00195	.	.
.08	.00265	.	.
.09	.00350	.	.
.10	.00452	.	.
.15	.01304	.	.
.20	.03030	.	.
.25	.06244	.	.
.30	.11952	.	.
.35	.21814	.	.
.40	.38609	.	.
.45	.67080	.	.
<b>.50</b>	<b>1.15529</b>	.	.
.55	1.98971	.	.
.60	3.45693	.	.
.65	6.11853	.	.
.70	11.16750	.	.
.75	21.37715	.	.
.80	44.05174	.	.
.85	102.32551	.	.
.90	295.47571	.	.
.91	381.72942	.	.
.92	504.19217	.	.
.93	684.64693	.	.
.94	963.52343	.	.
.95	1422.68336	.	.
.96	2248.79823	.	.
.97	3948.22364	.	.
.98	8343.66960	.	.
.99	27134.82058	.	.

Probit Transformed Responses



Lampiran 3 Analisis probit ekstrak diklorometana replikasi ke 2

EKSTRAK-2\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Parameter estimates converged after 11 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.76396	.05753	13.27883

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.07681	.06780	1.13295

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 10.418 DF = 3 P = .015

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

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

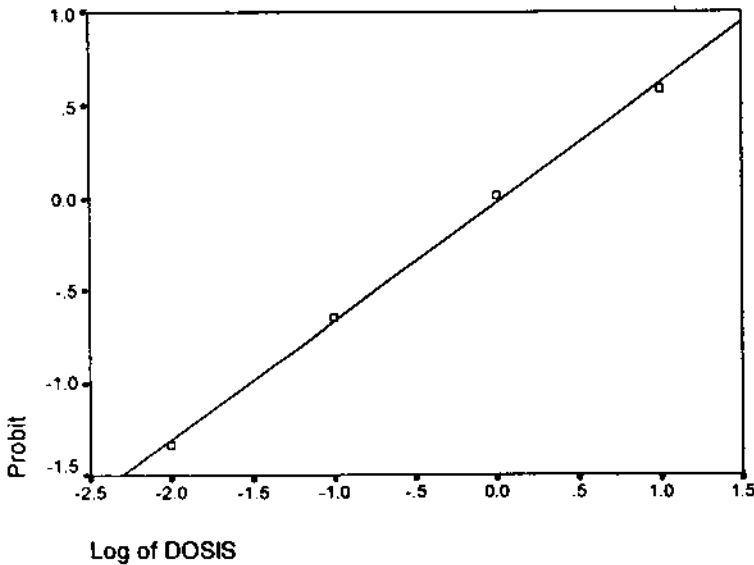
Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-2.00	100.0	9.1	7.338	1.722	.07338
-1.00	100.0	26.0	24.600	1.380	.24600
.00	100.0	50.8	53.061	-2.271	.53061
1.00	100.0	72.0	79.976	-7.936	.79976
2.00	100.0	100.0	94.572	5.428	.94572

**EKSTRAK-2 \* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \***  
**Confidence Limits for Effective DOSIS**

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00072	.00000	.00783
.02	.00163	.00001	.01422
.03	.00274	.00002	.02083
.04	.00405	.00004	.02783
.05	.00558	.00007	.03529
.06	.00732	.00012	.04327
.07	.00928	.00018	.05180
.08	.01149	.00026	.06093
.09	.01395	.00037	.07070
.10	.01667	.00050	.08115
.15	.03490	.00175	.14555
.20	.06278	.00469	.23626
.25	.10389	.01067	.36543
.30	.16332	.02184	.55274
.35	.24836	.04139	.83117
.40	.36968	.07388	1.25785
.45	.54321	.12562	1.93503
<b>.50</b>	<b>.79333</b>	<b>.20514</b>	<b>3.05238</b>
.55	1.15863	.32417	4.97583
.60	1.70248	.49953	8.44592
.65	2.53414	.75709	15.05377
.70	3.85375	1.13995	28.49289
.75	6.05825	1.72617	58.26024
.80	10.02578	2.67239	132.47172
.85	18.03528	4.34128	353.58499
.90	37.75521	7.79096	1247.73972
.91	45.13079	8.94442	1697.36066
.92	54.78501	10.38007	2373.87929
.93	67.80035	12.21103	3436.99263
.94	86.02374	14.62041	5203.14451
.95	112.85765	17.92609	8362.30871
.96	155.26132	22.73510	14629.04229
.97	229.81113	30.37908	29162.54234
.98	387.04868	44.51223	73203.48580
.99	880.22035	80.79350	314128.80410

**Probit Transformed Responses**



Lampiran 4 Analisis probit fraksi 14 ekstrak diklorometana replikasi ke 1

**FRAKSI-1 \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \***

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.

**\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \***

Parameter estimates converged after 12 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.81183	.06443	12.59946

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
.61682	.07950	7.75866

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 13.078 DF = 3 P = .004

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

**\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \***

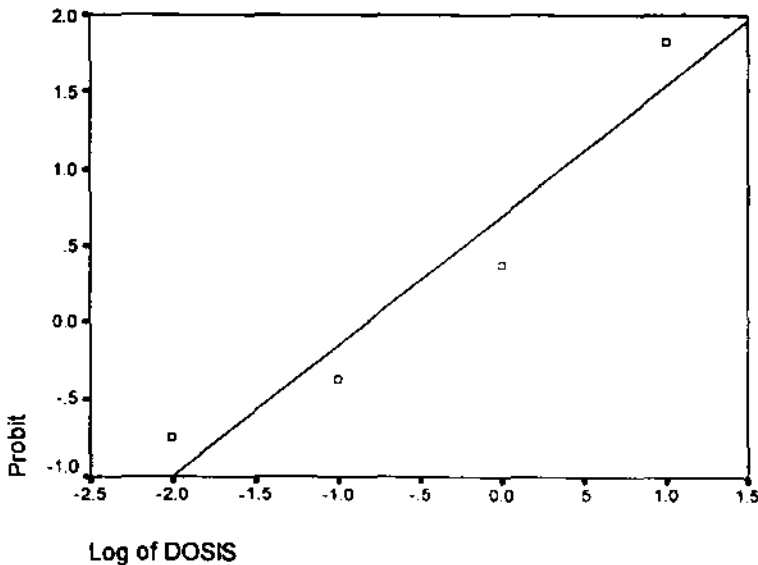
Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-2.00	100.0	22.8	15.701	7.089	.15701
-1.00	100.0	35.7	42.269	-6.559	.42269
.00	100.0	64.6	73.132	-8.512	.73132
1.00	100.0	96.6	92.345	4.255	.92345
2.00	100.0	100.0	98.747	1.253	.98747

FRAKSI-1\* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00024	.00000	.00340
.02	.00051	.00000	.00580
.03	.00084	.00000	.00816
.04	.00121	.00000	.01058
.05	.00164	.00000	.01309
.06	.00211	.00001	.01571
.07	.00264	.00001	.01845
.08	.00323	.00002	.02134
.09	.00388	.00002	.02438
.10	.00459	.00003	.02759
.15	.00919	.00013	.04655
.20	.01598	.00040	.07181
.25	.02567	.00101	.10606
.30	.03929	.00227	.15357
.35	.05829	.00470	.22135
.40	.08475	.00914	.32149
.45	.12174	.01684	.47579
<b>.50</b>	<b>.17386</b>	<b>.02965</b>	<b>.72527</b>
.55	.24831	.05015	1.15125
.60	.35668	.08185	1.92380
.65	.51861	.12977	3.42297
.70	.76941	.20164	6.57132
.75	1.17770	.31080	13.86674
.80	1.89193	.48321	33.16704
.85	3.28755	.77736	95.29479
.90	6.58877	1.35826	374.31651
.91	7.79346	1.54675	523.42096
.92	9.35308	1.77826	754.69713
.93	11.43051	2.06927	1130.58134
.94	14.30062	2.44606	1779.10204
.95	18.46350	2.95363	2990.43516
.96	24.92738	3.67645	5518.79714
.97	36.05297	4.79608	11760.19382
.98	58.88227	6.79804	32297.99246
.99	127.57555	11.68500	160047.71488

Probit Transformed Responses



Lampiran 5 Analisis probit fraksi 14 ekstrak diklorometana replikasi ke 2

**FRAKSI-2** \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 Parameter estimates converged after 11 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.73042	.05873	12.43709

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.50139	.07285	6.88243

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 9.425 DF = 3 P  
 = .024

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

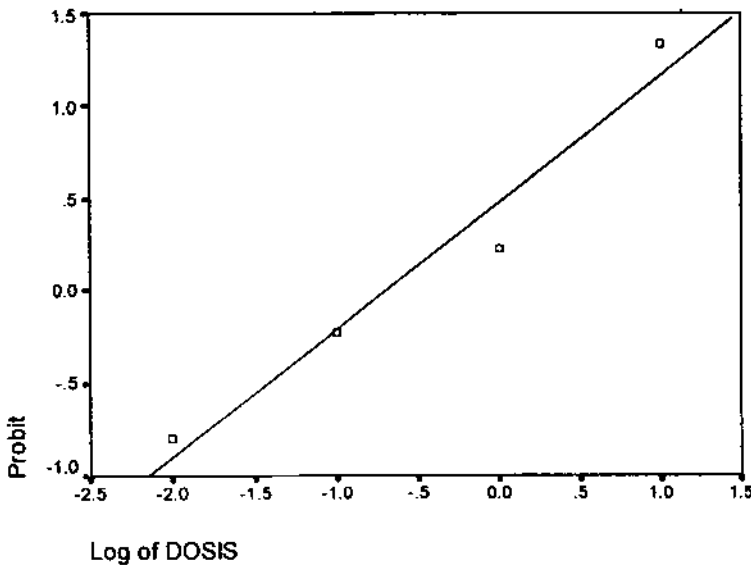
\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-2.00	100.0	21.2	16.867	4.313	.16867
-1.00	100.0	41.0	40.942	.028	.40942
.00	100.0	58.7	69.195	-10.515	.69195
1.00	100.0	91.0	89.099	1.871	.89099
2.00	100.0	100.0	97.513	2.487	.97513

FRAKSI-2 \* \* \* \* \* P R O B I T    A N A L Y S I S    \* \* \* \* \*  
 Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00013	.00000	.00192
.02	.00032	.00000	.00355
.03	.00055	.00000	.00525
.04	.00083	.00000	.00707
.05	.00115	.00001	.00902
.06	.00153	.00001	.01111
.07	.00196	.00002	.01335
.08	.00245	.00003	.01575
.09	.00301	.00004	.01832
.10	.00362	.00006	.02107
.15	.00785	.00022	.03798
.20	.01450	.00065	.06156
.25	.02455	.00160	.09459
.30	.03941	.00351	.14145
.35	.06110	.00716	.20929
.40	.09262	.01377	.31034
.45	.13852	.02525	.46630
<b>.50</b>	<b>.20586</b>	<b>.04449</b>	<b>.71768</b>
.55	.30592	.07569	1.14366
.60	.45753	.12503	1.90768
.65	.69358	.20180	3.36933
.70	1.07525	.32113	6.38586
.75	1.72581	.51022	13.22957
.80	2.92288	.82391	30.87237
.85	5.40163	1.39087	85.84805
.90	11.69800	2.59281	322.27918
.91	14.09828	3.00068	445.52583
.92	17.26715	3.51151	634.32990
.93	21.57950	4.16737	936.98960
.94	27.68057	5.03679	1451.16527
.95	36.77071	6.23943	2394.72268
.96	51.33285	8.00547	4323.60346
.97	77.36122	10.84411	8965.06716
.98	133.44841	16.16775	23731.22506
.99	315.15475	30.12401	110860.54945

Probit Transformed Responses





Lampiran 6 Analisis probit Isolat I ke I

**ISOLAT-1** \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 DATA Information

6 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

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	.33220	.03326	9.98723

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.48368	.07393	6.54266

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 6.868 DF = 4 P = .143

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

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

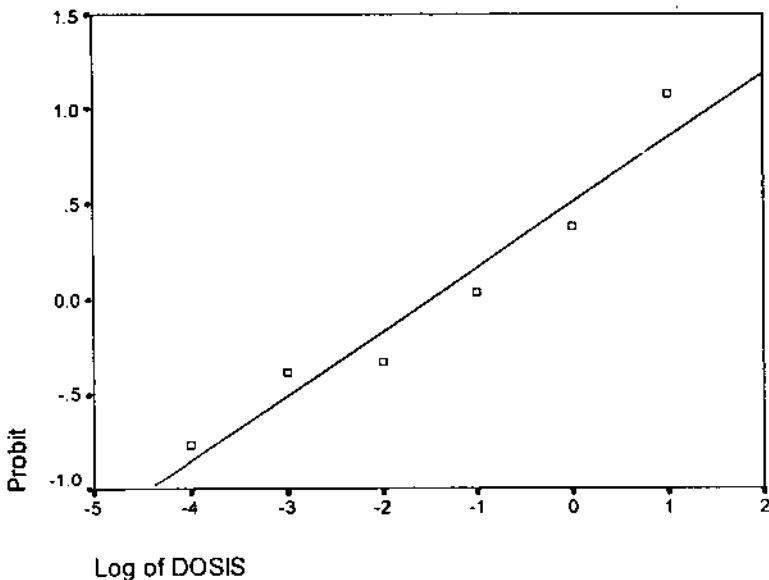
Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-4.00	100.0	22.0	19.902	2.098	.19902
-3.00	100.0	35.0	30.400	4.600	.30400
-2.00	100.0	37.0	42.829	-5.829	.42829
-1.00	100.0	51.5	56.020	-4.520	.56020
.00	100.0	64.8	68.569	-3.819	.68569
1.00	100.0	85.9	79.272	6.658	.79272

ISOLAT-1 \* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	3.477572E-09	3.109228E-13	.00000
.02	.00000	5.949498E-12	.00000
.03	.00000	3.858906E-11	.00000
.04	.00000	1.571885E-10	.00001
.05	.00000	4.919225E-10	.00001
.06	.00000	1.297341E-09	.00002
.07	.00000	3.032647E-09	.00002
.08	.00000	6.479585E-09	.00003
.09	.00000	.00000	.00005
.10	.00000	.00000	.00007
.15	.00003	.00000	.00025
.20	.00010	.00000	.00071
.25	.00033	.00001	.00181
.30	.00092	.00007	.00431
.35	.00242	.00027	.01007
.40	.00605	.00094	.02376
.45	.01465	.00292	.05855
<b>.50</b>	<b>.03500</b>	<b>.00823</b>	<b>.15488</b>
.55	.08362	.02120	.44814
.60	.20261	.05107	1.43207
.65	.50574	.11846	5.08945
.70	1.32612	.27298	20.39624
.75	3.75303	.64591	94.91847
.80	11.95308	1.63359	542.65765
.85	46.12138	4.69320	4250.99917
.90	252.20618	17.27678	58074.73746
.91	380.16287	23.60173	109513.54418
.92	593.71081	33.09088	218352.00313
.93	969.29131	47.93363	466793.72026
.94	1675.74225	72.42602	1091764.70748
.95	3128.71245	115.82330	2880840.29706
.96	6515.41235	200.78189	9020436.36298
.97	16054.28309	394.16105	36763866.1585
.98	53237.79277	963.84812	238592761.468
.99	352205.37543	3927.66974	4568560459.47

Probit Transformed Responses



Lampiran 7 Analisis probit Isolat I ke 2

**ISOLAT-2** \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 DATA Information

6 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 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	.29562	.03256	9.07839

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
.55593	.07433	7.47898

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2.025 DF = 4 P = .731

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

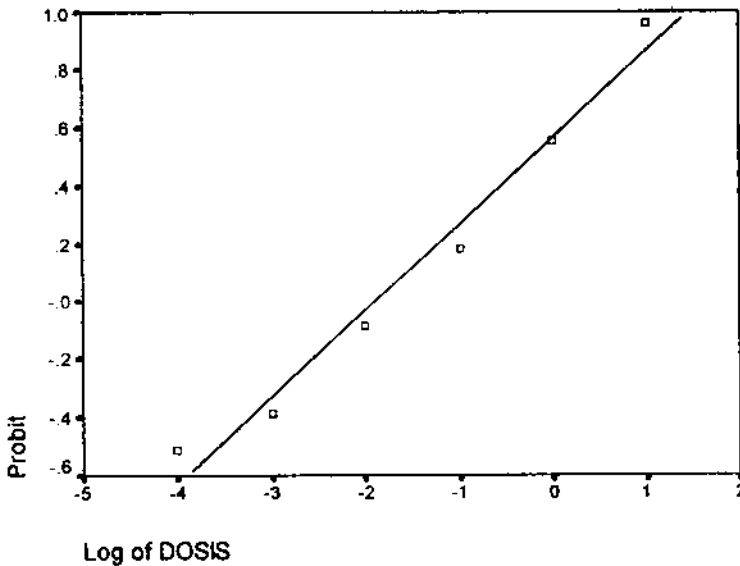
Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-4.00	100.0	30.5	26.548	3.942	.26548
-3.00	100.0	34.9	37.035	-2.135	.37035
-2.00	100.0	46.6	48.592	-2.012	.48592
-1.00	100.0	57.3	60.269	-2.949	.60269
.00	100.0	71.0	71.087	-.107	.71087
1.00	100.0	83.1	80.277	2.833	.80277

**ISOLAT-2 \* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \***  
 Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	1.778464E-10	9.228149E-13	5.446918E-09
.02	1.486526E-09	1.370021E-11	.00000
.03	5.717852E-09	7.576492E-11	.00000
.04	.00000	2.740306E-10	.00000
.05	.00000	7.791940E-10	.00000
.06	.00000	1.895304E-09	.00000
.07	.00000	4.129756E-09	.00000
.08	.00000	8.290373E-09	.00000
.09	.00000	.00000	.00000
.10	.00000	.00000	.00000
.15	.00000	.00000	.00002
.20	.00002	.00000	.00008
.25	.00007	.00001	.00025
.30	.00022	.00004	.00069
.35	.00065	.00017	.00179
.40	.00183	.00057	.00451
.45	.00495	.00182	.01144
<b>.50</b>	<b>.01317</b>	<b>.00542</b>	<b>.02987</b>
.55	.03504	.01532	.08240
.60	.09472	.04152	.24496
.65	.26477	.11032	.79650
.70	.78225	.29608	2.87997
.75	2.51800	.83179	11.90825
.80	9.25583	2.56344	59.29826
.85	42.20963	9.33127	392.96489
.90	284.82567	46.58060	4320.17700
.91	451.69805	68.54876	7723.74067
.92	745.44119	104.23170	14528.86158
.93	1293.11737	165.12693	29124.21762
.94	2392.29262	275.84154	63370.91972
.95	4825.36689	494.82683	153930.25805
.96	11003.54102	982.23143	437092.65874
.97	30314.51145	2279.09721	1578686.66401
.98	116603.32033	6966.20099	8717487.39297
.99	974626.98567	40416.30378	129196997.239

**Probit Transformed Responses**



Lampiran 8 Analisis probit kloroquin difosfat ke 1

KLOROQUIN-1 \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Parameter estimates converged after 11 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	,39130	,04851	8,06605

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
1,03771	,09167	11,32009

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 16,755 DF = 3 P = ,001

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

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Observed and Expected Frequencies

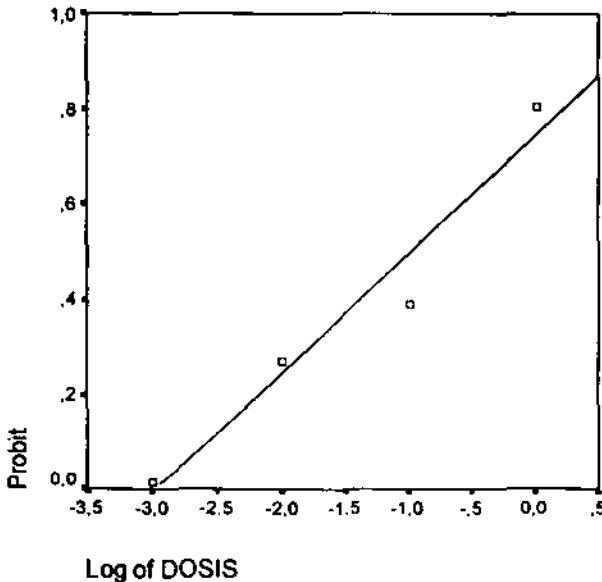
DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-3,00	100,0	50,6	44,583	5,977	,44583
-2,00	100,0	60,7	60,068	,602	,60068
-1,00	100,0	65,2	74,099	-8,929	,74099
,00	100,0	79,0	85,030	-6,030	,85030
1,00	100,0	100,0	92,350	7,650	,92350

KLOROQUIN-1 \* \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	2,528756E-09	4,256059-109	,00001
,02	,00000	8,459665E-99	,00002
,03	,00000	2,883753E-92	,00004
,04	,00000	2,362142E-87	,00006
,05	,00000	2,340322E-83	,00009
,06	,00000	5,887535E-80	,00011
,07	,00000	5,638717E-77	,00015
,08	,00000	2,630975E-74	,00018
,09	,00000	7,031182E-72	,00023
,10	,00000	1,204067E-69	,00028
,15	,00001	2,108528E-60	,00062
,20	,00002	4,605486E-53	,00120
,25	,00004	8,959512E-47	,00215
,30	,00010	3,901980E-41	,00370
,35	,00023	6,391762E-36	,00628
,40	,00050	5,475915E-31	,01073
,45	,00106	3,081351E-26	,01899
,50	,00223	1,340683E-21	,03619
,55	,00467	4,995167E-17	,08057
,60	,00990	1,568472E-12	,25544
,65	,02152	,00000	2,13298
,70	,04377	,00005	303,36643
,75	,11797	,00265	4621811,72293
,80	,31541	,01725	2471436049619
,85	,99250	,06015	2,992278E+19
,90	4,19900	,18712	3,783157E+28
,91	5,94900	,23824	6,171191E+30
,92	8,68580	,30701	1,576825E+33
,93	13,16856	,40230	7,056272E+35
,94	20,95963	,53947	6,498118E+38
,95	35,61144	,74730	1,574983E+42
,96	66,38221	1,08574	1,505447E+46
,97	142,74161	1,70042	1,190307E+51
,98	394,95712	3,04590	3,913114E+57
,99	1964,24489	7,47159	7,468224E+67

Probit Transformed Responses



Lampiran 9 Analisis probit kloroquin difosfat ke 2

KLOROQUIN-2 \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 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.

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

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	,52044	,05323	9,77761

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
1,24753	,10414	11,97978

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 12,417 DF = 3 P = ,006

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

\* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

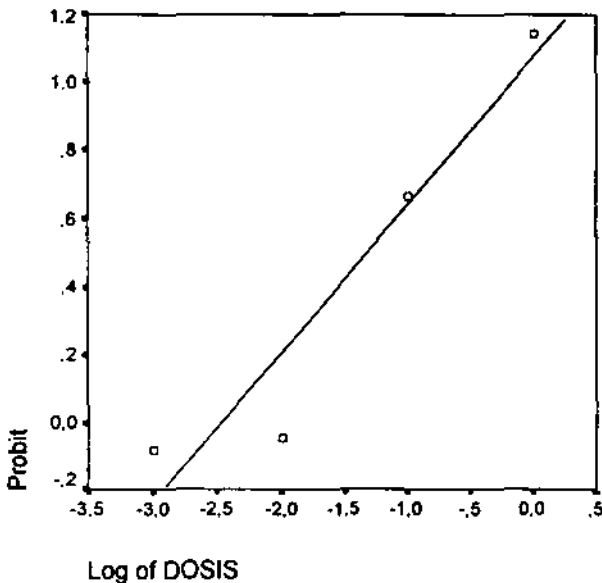
Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-3,00	100,0	46,8	37,683	9,157	,37683
-2,00	100,0	48,1	58,185	-10,085	,58185
-1,00	100,0	74,7	76,641	-1,961	,76641
,00	100,0	87,3	89,390	-2,050	,89390
1,00	100,0	100,0	96,147	3,853	,96147

KLOROQUIN-2 \* \* \* \* P R O B I T   A N A L Y S I S \* \* \* \* \*  
 Confidence Limits for Effective DOSIS

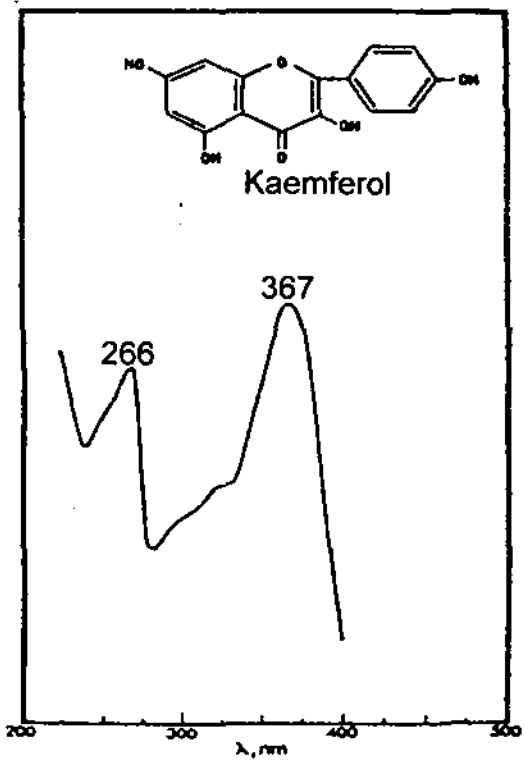
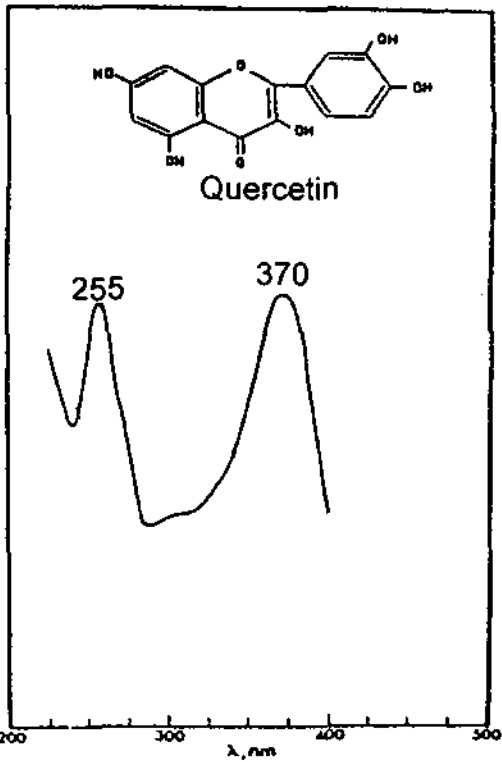
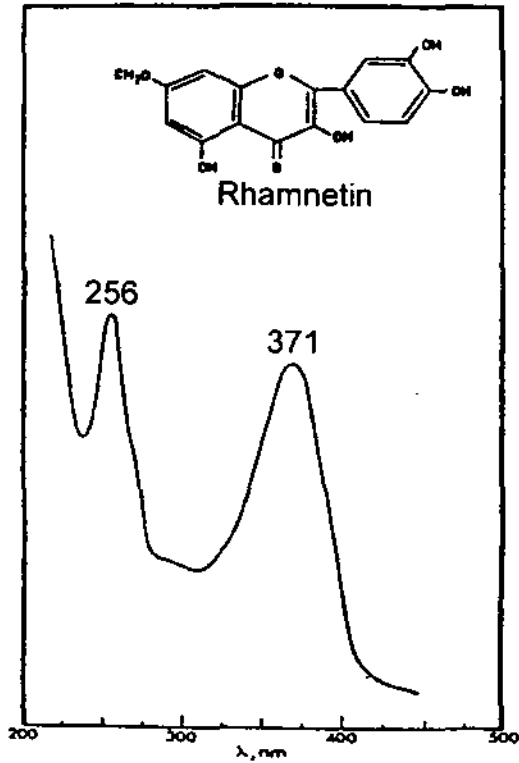
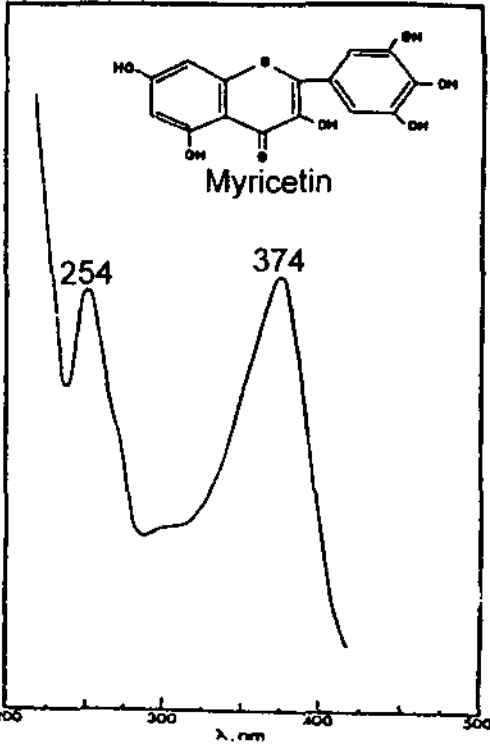
Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	,00000	3,597043E-18	,00002
,02	,00000	1,248492E-16	,00005
,03	,00000	1,181879E-15	,00008
,04	,00000	6,399865E-15	,00011
,05	,00000	2,525416E-14	,00015
,06	,00000	8,115242E-14	,00019
,07	,00001	2,256418E-13	,00024
,08	,00001	5,632797E-13	,00029
,09	,00001	1,293413E-12	,00035
,10	,00001	2,778136E-12	,00042
,15	,00004	6,526423E-11	,00084
,20	,00010	7,915917E-10	,00150
,25	,00020	6,643296E-09	,00249
,30	,00039	,00000	,00398
,35	,00073	,00000	,00626
,40	,00131	,00000	,00987
,45	,00230	,00001	,01583
,50	<b>,00401</b>	<b>,00003</b>	<b>,02636</b>
,55	,00699	,00011	,04687
,60	,01230	,00040	,09286
,65	,02205	,00136	,21760
,70	,04079	,00408	,64859
,75	,07924	,01068	2,63578
,80	,16599	,02520	15,55798
,85	,39301	,05719	147,65790
,90	1,16246	,13789	2914,08563
,91	1,51054	,16798	6080,43037
,92	2,00776	,20718	13583,03677
,93	2,74534	,25968	33028,63857
,94	3,89364	,33251	89543,97738
,95	5,80014	,43849	280770,94891
,96	9,26379	,60332	1081502,21570
,97	16,47335	,88695	5715746,72008
,98	35,40823	1,46684	52749135,7404
,99	118,27297	3,19259	1778254721,91

Probit Transformed Responses





Lampiran 11 Profil spektra UV-Vis beberapa senyawa flavonol (Dikutip dari Marby dkk., 1970)



Lampiran 15 Profil spektra UV-Vis beberapa senyawa flavonol (Dikutip dari Marby dkk., 1970)

