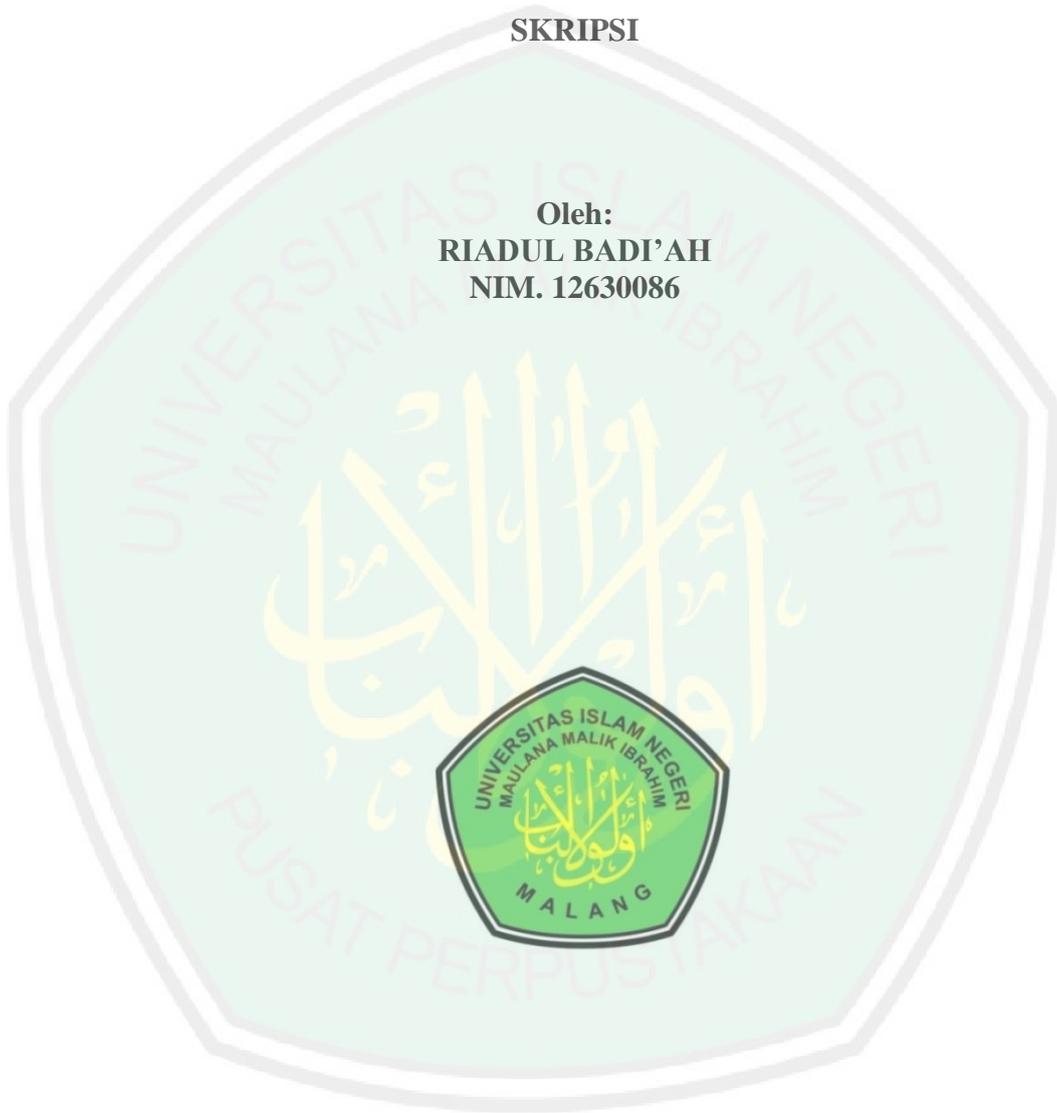


**UJI AKTIVITAS FRAKSI ETIL ASETAT DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) SEBAGAI ANTIMALARIA PADA PARASIT  
*Plasmodium falciparum* STRAIN 3D7**

SKRIPSI

Oleh:  
**RIADUL BADI'AH**  
NIM. 12630086



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2017**

**UJI AKTIVITAS FRAKSI ETIL ASETAT DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) SEBAGAI ANTIMALARIA PADA PARASIT  
*Plasmodium falciparum* STRAIN 3D7**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
RIADUL BADI'AH  
NIM. 12630086**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2017**

**UJI AKTIVITAS FRAKSI ETIL ASETAT DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) SEBAGAI ANTIMALARIA PADA PARASIT  
*Plasmodium falciparum* STRAIN 3D7**

SKRIPSI

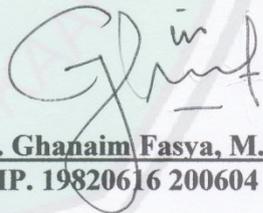
Oleh:  
**RIADUL BADI'AH**  
NIM. 12630086

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 23 Januari 2017

Pembimbing I

  
**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

Pembimbing II

  
**A. Ghanaim Fasya, M.Si**  
NIP. 19820616 200604 1 002

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia



**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI AKTIVITAS FRAKSI ETIL ASETAT DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) SEBAGAI ANTIMALARIA PADA PARASIT  
*Plasmodium falciparum* STRAIN 3D7**

SKRIPSI

Oleh:  
**RIADUL BADI'AH**  
NIM. 12630086

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 23 Januari 2017

Penguji Utama	: Dr. Anton Prasetyo, M.Si NIP. 19770925 200604 1 003	(  )
Ketua Penguji	: Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt NIPT. 20130902 2 317	(  )
Sekretaris Penguji	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(  )
Anggota Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(  )

Mengesahkan,  
**Ketua Jurusan Kimia**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Riadul Badi'ah  
NIM : 12630086  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Fraksi Etil Asetat Daun Bunga Matahari  
(*Helianthus Annuus* L.) sebagai Antimalaria pada Parasit  
*Plasmodium falciparum* Strain 3d7

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 Januari 2017  
Yang membuat pernyataan,



Riadul Badi'ah  
NIM. 12630086

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan tugas akhir/skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Ayah dan ibu tercinta yang telah banyak memberikan nasihat, doa, dan dukungan baik moral maupun materil yang tak mungkin terbalaskan juga keluarga besar penulis.
2. Ibu Dr. Bayyinatul Muchtaromah, drh. M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, Roihatul Muti'ah, M.Kes,Apt, dan Bapak A. Ghanaim Fasya selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah memberikan pengarahan dan pesngalaman berharga
5. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengamalkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
6. Teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2012 khususnya team Analitik dan semua mahasiswa Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberi motivasi, informasi dan masukannya kepada penulis dalam menyelesaikan proposal penelitian ini.
7. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penyusun.

Penulis sangat menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih terdapat banyak kesalahan serta kekurangan. Sebagai manusia yang tak pernah lepas dari kekhilafan maka penulis meminta maaf yang sebesar-besarnya apabila dalam penyusunan laporan ini terdapat kesalahan. Untuk itu dengan segala kerendahan

hati, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan dan peningkatan kualitas serta profesionalitas dalam dunia pendidikan serta dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca pada umumnya. Aamiin.

Malang, 23 Januari 2017

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>ABSTRAK</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	8
1.4 Batasan Masalah .....	8
1.5 Manfaat Penelitian .....	9
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	
2.1 Tanaman Bunga Matahari ( <i>Helianthus annuus</i> L.) .....	10
2.1.1 Deskripsi Umum .....	10
2.1.2 Klasifikasi .....	10
2.1.3 Morfologi .....	11
2.1.4 Kegunaan .....	11
2.1.5 Kandungan Senyawa Kimia .....	12
2.2 Malaria .....	13
2.2.1 Deskripsi Malaria .....	13
2.2.2 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	14
2.2.3 Penyebaran Malaria .....	16
2.2.4 Siklus Hidup <i>Plasmodium</i> .....	16
2.2.5 Antimalaria .....	18
2.2.6 Klasifikasi dan Jenis Obat Malaria .....	19
2.3 Senyawa Aktif Antimalaria .....	20
2.3.1 Triterpenoid .....	21
2.3.2 Seskuiterpenoid .....	22
2.3.3 Steroid .....	23
2.3.2 Artemisinin .....	24
2.4 Metode Pemisahan Senyawa Aktif Daun Bunga Matahari .....	25
2.4.1 Teknik Ekstraksi .....	25
2.4.2 Pemekatan Ekstrak Menggunakan <i>Rotary Evaporator Vacuum</i> ..	28
2.5 Metode Pengujian <i>In Vitro</i> pada <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
2.6 Identifikasi Senyawa Aktif dengan LC-MS .....	29
2.7 Metode Probit .....	32
2.8 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam .....	33

**BAB III METODOLOGI**

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian .....	36
3.2 Alat dan Bahan.....	36
3.2.1 Alat.....	36
3.2.2 Bahan.....	36
3.3 Rancangan Penelitian .....	37
3.4 Tahapan Penelitian .....	38
3.5 Prosedur Kerja.....	38
3.5.1 Preparasi Sampel.....	38
3.5.2 Ekstraksi Maserasi dan Partisi Daun Bunga Matahari.....	38
3.5.3 Uji Skrining Fitokimia .....	39
3.5.3.1 Uji Terpenoid .....	39
3.5.3.2 Uji Seskuiterpen .....	40
3.5.3.3 Uji Triterpen/Steroid .....	40
3.5.4 Prosedur Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vitro</i> .....	41
3.5.4.1 Pencairan Parasit .....	41
3.5.4.2 Pemantauan Kultur.....	41
3.5.4.3 Sinkronisasi Parasit .....	41
3.5.4.4 Persiapan Suspensi Parasit .....	42
3.5.4.5 Persiapan Bahan Uji.....	42
3.5.4.6 Uji Aktivitas Antimalaria.....	43
3.6 Identifikasi Senyawa menggunakan UPLC-MS .....	44
3.7 Analisis Data menggunakan Metode Probit.....	45

**BAB IV PEMBAHASAN**

4.1 Preparasi Sampel .....	46
4.2 Ekstraksi Maserasi dan Partisi Daun Bunga Matahari .....	48
4.3 Uji Fitokimia .....	53
4.4 Uji Antimalaria .....	55
4.5 Identifikasi Senyawa dengan UPLC/QToF/MS/MS System .....	60
4.6 Mekanisme Kerja Senyawa Artemisinin sebagai Antimalaria .....	70
4.7 Pemanfaatan Daun Bunga Matahari dalam Perspektif Islam.....	71

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan.....	74
5.1 Saran.....	74

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>75</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>80</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tingkat Polaritas Pelarut.....	26
Tabel 4.1 Hasil Ekstraksi Maserasi dan Partisi Daun Bunga Matahari .....	52
Tabel 4.2 Hasil Pengamatan Uji Fitokimia.....	53
Tabel 4.3 Hasil Pengujian Antimalaria Secara <i>In Vitro</i> .....	57
Tabel 4.4 Kandungan Senyawa yang Diduga Terkandung dalam Daun Bubga Matahari .....	61



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun Bunga Matahari ( <i>Helianthus Annuus L.</i> ).....	10
Gambar 2.2 Siklus Hidup Parasit Malaria.....	18
Gambar 2.3 Struktur Senyawa Triterpenoid .....	21
Gambar 2.4 Struktur Senyawa Seskuiterpen Lakton .....	22
Gambar 2.5 Struktur Senyawa Steroid.....	23
Gambar 2.6 Struktur Senyawa Artemisinin .....	25
Gambar 2.7 Alat <i>Rotary Evaporator Vacuum</i> .....	28
Gambar 2.8 Instrumentasi LCMS/MS .....	30
Gambar 2.9 Skema Spektrometer Massa .....	32
Gambar 3.1 Pola Sumur Uji ( <i>Plat Well 24</i> ) .....	43
Gambar 3.2 Pola Pembuatan Apusan Darah .....	44
Gambar 4.1 Serbuk Daun Bunga Matahari dengan Ayakan 60 Mesh .....	47
Gambar 4.2 Proses Perendaman (Maserasi).....	48
Gambar 4.3 Proses Penyaringan Menggunakan Corong <i>Buchner</i> .....	49
Gambar 4.4 Pemekatan Filtrat dengan <i>Rotary Evaporator Vacuum</i> .....	50
Gambar 4.5 Proses Partisi Menggunakan Etil Asetat .....	51
Gambar 4.6 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol.....	54
Gambar 4.7 Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat .....	54
Gambar 4.8 Pembuatan Slide Apusan Darah Tipis.....	56
Gambar 4.9 Pewarnaan Slide Dengan Giemsa .....	56
Gambar 4.10 Pengamatan Parasit Hasil Uji Antimalaria.....	56
Gambar 4.11 Grafik Hubungan Antara Persen Penghambatan dan Konsentrasi....	59
Gambar 4.12 Kromatogram UPLC-MS Hasil Pemisahan Sampel Fraksi Etil Asetat Daun Bunga Matahari.....	60
Gambar 4.13 Spektrum Massa dari <i>Artemisinin</i> .....	62
Gambar 4.14 Fragmentasi Senyawa <i>Artemisinin</i> .....	64
Gambar 4.15 Spektrum Massa dari <i>Heliangolide</i> .....	64
Gambar 4.16 Fragmentasi Senyawa <i>Heliangolide</i> .....	65
Gambar 4.17 Spektrum Massa dari Asam Linolenat .....	65
Gambar 4.18 Fragmentasi Senyawa Asam Linolenat .....	66
Gambar 4.19 Spektrum Massa dari <i>Eupalinolide C</i> .....	67
Gambar 4.20 Fragmentasi Senyawa <i>Eupalinolide C</i> .....	68
Gambar 4.21 Spektrum Massa dari Asam Linoleat .....	68
Gambar 4.22 Fragmentasi Senyawa Asam Linoleat .....	69

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian .....	80
Lampiran 2 Skema Kerja .....	81
Lampiran 3 Pembuatan Larutan .....	88
Lampiran 4 Perhitungan .....	89
Lampiran 5 Halaman Persembahan .....	92



## ABSTRAK

Badi'ah, R. 2016. Uji Aktivitas Fraksi Etil Asetat Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Sebagai Antimalaria Pada Parasit *Plasmodium falciparum* Strain 3D7. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Konsultan: Roihatul Muti'ah, M.Kes,Apt

**Kata Kunci** : Daun bunga matahari, Antimalaria, *Plasmodium falciparum* Strain 3D7, UPLC-MS

Infeksi malaria sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang serius dan kompleks di dunia. Kesulitan pengobatan malaria disebabkan karena terjadinya resistensi parasit malaria terhadap obat sintesis. Salah satu alternatif untuk mencegah terjadinya resistensi adalah dengan memakai obat herbal seperti tanaman Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi etil asetat daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) sebagai antimalaria pada parasit *Plasmodium falciparum* Strain 3D7.

Ekstraksi daun bunga matahari dilakukan dengan menggunakan pelarut methanol, kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut etil asetat dan dilanjutkan uji fitokimia. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimalaria pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat, kemudian ekstrak terbaik dari uji antimalaria dilanjutkan dengan identifikasi senyawa aktif menggunakan metode kromatografi *ultra performance liquid chromatography-mass spectroscopy* (UPLC-MS).

Hasil uji fitokimia dari ekstrak metanol dan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa terpenoid, seskuiterpen, dan steroid. Hasil uji aktivitas antimalaria ekstrak metanol mempunyai nilai  $IC_{50}$  22,18  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan fraksi etil asetat mempunyai nilai  $IC_{50}$  16,68  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil uji senyawa fraksi etil asetat menggunakan UPLC-MS diperoleh 5 puncak tertinggi yaitu senyawa *artemisinin*, *heliangolide*, *asam linolenat*, *eupalinolide C* dan *asam linoleat* pada m/z berturut-turut yaitu 282, 358, 278, 443, dan 280.

## ABSTRAK

Badi'ah, R. 2016. The Test of Ethyl Acetate Fraction Activity of Sunflower Leafs (*Helianthus annuus* L.) as an Antimalarial at the *Plasmodium falciparum* 3D7 Parasites. Thesis. Departement of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University. Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor II: Ahmad Ghanaim Fasya, M.Si; Consultant: Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt.

**Keywords:** Sunflower leaves, Antimalarial, *Plasmodium falciparum* Strain 3D7, UPLC-MS

The infection of Malaria still remains a serious and complex problem for human's health in the world. The difficulty of healing Malaria was caused by malaria parasite resistance on synthetic drugs. One of the alternatives to prevent the resistance was the use of herbal drugs such as sunflower plant (*Helianthus annuus* L.). The purpose of this research was to know the activity of ethyl acetate fraction of sunflower leaves as an antimalarial at the *Plasmodium falciparum* Strain 3D7 parasites.

The extraction of sunflower leaves was proceeded with the use of methanol solvent. It was then followed by fractination with ethyl acetate solvent and phytochemical test. Test of antimalarial activity was proceeded over methanol extract and fraction of ethyl acetate. Afterward, the best extract from antimalarial test continued by active compound identification used chromatography method of *ultra performance liquid chromatography-mass spectroscopy* (UPLC-MS).

The test result of phytochemical on methanol extract and fraction of ethyl acetate was positive that they contain terpenoids, sesquiterpen, and steroid compounds. The test result of antimalarial activity of methanol extract had  $IC_{50}$  value was 22,18  $\mu\text{g/ml}$ , while fraction of ethyl acetate had  $IC_{50}$  value was 16,68  $\mu\text{g/ml}$ . The result of active compound ethyl acetate fraction used UPLC-MS were 5 highest peaks which are *artemisinin*, *heliangolides*, *linolenic acid*, *eupalinolides C* and *linoleic acid* at m/z counted in order as follow 282, 358, 278, 443, and 280.

## حلاصه

البديعة، ر. ٢٠١٦. اختبار عملية الأثيل الاسيتات التجزئه ورقة دوار الشمس (هيليانثوس أنوس ل.) كالأدوية المضادة للملاريا في فلانسموديوم فالسيفاروم ٧٥٣ سترين. أطروحة. قسم الكيمياء و كلية العلوم والتكنولوجيا في جامعة الحكومية الإسلامية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف الأول: ايلوك كامله حياة الماجستير. المشرف الثاني: أحمد غنائم فاشا الماجستير. مستشار: ريثحة المتبعة الماجستير.

كلمات البحث: ورقة دوار الشمس, أدوية المضادة للملاريا, فلانسموديوم فالسيفاروم ٧٥٣, UPLC-MS

عدوى الملاريا لا يزال ان يكون مشكلة صحية خطيرة ومعقدة في العالم حتى الان. العلاج صعوبة الملاريا بسبب حدوث مقاومة طفيل الملاريا للأدوية الاصطناعية. بديل واحد لمنع المقاومة من خلال استخدام العلاجات العشبية مثل النباتات دوار الشمس (هيليانثوس أنوس ل.). وتهدف هذه الدراسة للمعروف العملية الأثيل الاسيتات التجزئه ورقة دوار الشمس (هيليانثوس أنوس ل.) كالأدوية المضادة للملاريا في فلانسموديوم فالسيفاروم ٧٥٣ سترين.

استخلاص ورقة دوار الشمس يستخرج عن الطريق أنقع باستخدام الميثانول. وعلاوة على ذلك، واستخراج السائل السائل مع خللات الإثيل الاسيتات واستمر اختبار الكيميائي النباتي. الاختبار الادوية المضادة للملاريا على الميثانول المتقطعة والأثيل الاسيتات التجزئه. ثم استخراج الأفضل من الاختبار الادوية المضادة للملاريا استمر مع مركب نشط باستخدام طرق الكروماتوغرافي UPLC-MS. نتائج الاختبار الكيميائي النباتي من الميثانول المتقطعة والأثيل الاسيتات التجزئه كسور إيجابية للمركبات ترفينوند و سسكوثيرفينوند و ستيراند. نتائج اختبار من الادوية المضادة للملاريا على الميثانول تثبيط في القيم  $IC_{50}$  ١٨, ٢٢ ميكرو غرام/لتر و من الأثيل الاسيتات التجزئه تثبيط في القيم  $IC_{50}$  ٦٨, ١٦ ميكرو غرام/لتر. نتائج الاختبار مركب نشط باستخدام طرق الكروماتوغرافي UPLC-MS من الأثيل الاسيتات التجزئه أن أعلى قمة هي مجتمعات سكينه أرتيميسين و هيلينا عولد حمض اللينوليك و ايفالينولد د و حمض اللينولينك على م/ز التوالي ٢٨٢ و ٣٥٨ و ٢٧٨ و ٤٤٣ و ٢٨٠.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan suatu penyakit infeksi yang sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang serius dan kompleks. Penyakit ini disebabkan oleh empat spesies parasit protozoa dari jenis *Plasmodium* yang ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk (Guerra, dkk., 2006). Parasit *Plasmodium falciparum* merupakan jenis parasit malaria yang paling mematikan (WHO, 2006).

Indonesia merupakan salah satu negara yang masih berisiko terjangkit malaria. Berdasarkan laporan riset kesehatan dasar menunjukkan bahwa hingga tahun 2012 terdapat 374 kabupaten endemis malaria. Jumlah kasus malaria di Indonesia mencapai 256.592 orang dari 1.322.451 kasus suspek malaria yang diperiksa sediaan darahnya dengan *Annual Parasite Incidence* (API) 1,75 per seribu penduduk pada tahun 2011, artinya setiap 1000 penduduk di daerah endemis terdapat 2 orang terkena malaria (WHO, 2006).

Salah satu contoh nyamuk yang banyak menimbulkan dampak kematian pada manusia adalah nyamuk *Anopheles*. Nyamuk *Anopheles* merupakan salah satu genus nyamuk yang berperan dalam penyebaran parasit malaria (misalnya *P. falciparum*), sebagaimana dalam Al Quran yang disebutkan pada QS. al Baqarah (2):2

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴿٢٦﴾

Artinya : “ Sesungguhnya Allah SWT tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah SWT menjadikan ini untuk perumpamaan?." dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah SWT, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. dan tidak ada yang disesatkan Allah SWT kecuali orang-orang yang fasik” (QS. al Baqarah (2): 26).

Kata “*Ba’udhah*” dalam tafsir al-Jalalain diartikan sebagai bentuk tunggal dari kata “ *Ba’udh*” yaitu kutu yang kecil. Berdasarkan tafsir al Mishbah, kutu yang dimaksud adalah hewan yang jika menggigit akan menimbulkan rasa sakit dan hewan tersebut berbau sangat busuk. Kata tersebut juga dapat diartikan sebagai nyamuk dan sejenisnya. Al Jamal menambahkan meskipun hewan tersebut kecil, belalainya mampu menembus kulit manusia, gajah, kerbau, dan unta sehingga dapat menyebabkan kematian (Shihab, 2000).

Tafsir Muyassar menambahkan bahwa perumpamaan yang dimisalkan dengan nyamuk atau lebih rendah darinya memiliki tanda-tanda kebesaran Allah SWT. Orang beriman akan meyakini bahwa perumpamaan ini benar dan datangnya pasti dari sisi Allah SWT dan semakin bertambah keimanannya dan orang kafir semakin bertambah kekafirannya. Hal ini seperti yang telah dijelaskan dalam Firman Allah SWT Q.S ali Imron (3):191.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya :“ (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah SWT sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, maka peliharalah Kami dari siksa neraka” (Q.S Ali Imron (3): 191).

Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan makna kata-kata berpikir dalam surat ali Imron adalah berusaha untuk memahami segala sesuatu yang ada diantara langit dan bumi serta beberapa hikmah yang menunjukkan keagungan sang pencipta. Penciptaan seluruh makhluk di dunia ini tiada yang sia-sia, oleh karenanya manusia hendaknya berpikir dan memanfaatkan ciptaan-Nya.

Salah satu masalah yang harus dipikirkan oleh manusia adalah pemecahan masalah atas meningkatnya kasus malaria yang disebabkan oleh berbagai faktor. Salah satunya karena adanya kasus malaria yang resisten terhadap obat malaria. Penggunaan obat malaria semakin sulit disebabkan adanya resistensi parasit malaria khususnya *P. falciparum* terhadap obat yang ada seperti klorokuin dan aminodiakulin. Pertama kali kasus retensi ditemukan pada tahun 1960-1961 di Kolumbia dan Brazil, kemudian ditemukan secara berturut-turut di Asia Tenggara yaitu Muangthai, Malaysia, Kamboja, Laos, Vietnam, dan Filipina. Kasus di Indonesia sendiri ditemukan di daerah Kalimantan Timur (1974), Jawa Tengah (Jepara,1981), dan Jawa Barat (1981) (Manjoer, 2001).

Laporan terjadinya resistensi *P. falciparum* terhadap obat antimalaria di Indonesia antara lain terjadi pada klorokuin, sulfadoksin-primetamin. Wilayah Jawa Tengah pada tahun 2004 ditemukan kegagalan 5 % pada penggunaan

klorokuin sehingga obat ini tidak efektif lagi digunakan sebagai obat antimalaria. Resistensi malaria terjadi karena strain parasit mampu bertahan hidup dan bertambah banyak meskipun sudah diberikan obat antimalaria dengan dosis sama atau lebih tinggi dari dosis standar yang dianjurkan yang masih dapat ditoleransi manusia (Nengatik, 2011).

Salah satu pemanfaatan ragam hayati dalam penanggulangan malaria adalah melalui eksplorasi senyawa aktif dari bahan obat alam. Menurut Dzulkarnain (1998), tanaman obat di Indonesia dapat dijadikan sebagai antimalaria yang bersifat *antiplasmodia* dan juga bersifat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit malaria. Tanaman obat tersebut salah satunya adalah tanaman bunga matahari yang dapat digunakan sebagai tanaman obat-obatan.

Tanaman bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) merupakan tanaman yang dibudidayakan oleh masyarakat sebagai tanaman hias yang mempunyai nilai estetika tinggi. Tanaman ini tergolong satu famili dengan *Artemisia annua* yaitu *Asteraceae*, selain sebagai tanaman hias pemanfaatan bunga matahari pada bagian bunga dan biji adalah sebagai sumber minyak yang kaya asam linoleat, sedangkan bagian daunnya belum dimanfaatkan secara optimal. Keberadaannya yang melimpah, mudah didapat dan dibudidayakan menjadi peluang untuk meningkatkan nilai gunanya sebagai salah satu sumber obat antimalaria (Nengatik, 2011).

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Haniah, dkk., (2012) menunjukkan bahwa identifikasi ekstrak metanol daun bunga matahari menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT), instrumen spektrofotometer *ultraviolet visible* (UV-Vis) dan *fourier transform infrared* (FTIR) diperoleh senyawa alkaloid dan

triterpenoid. Hal ini diperkuat dengan penelitian Triastutik (2013) yang menunjukkan hasil ekstrak metanol daun bunga matahari positif mengandung senyawa terpenoid, seskuiterpen, triterpen dan steroid, sedangkan ekstrak fraksi etil asetat daun bunga matahari positif terpenoid, seskuiterpen, dan triterpen.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, dugaan senyawa aktif dalam daun bunga matahari yang berpotensi sebagai antimalaria yaitu senyawa seskuiterpen. Hal ini didukung dengan penelitian tanaman paitan yang masih dalam satu famili dengan tanaman *Helianthus annuus* L. yaitu *Compositae*, telah dilaporkan bahwa senyawa dari fraksi metanol bunga paitan memberikan hasil positif terhadap golongan seskuiterpen lakton. Senyawa seskuiterpen lakton mempunyai peranan penting dalam membunuh parasit malaria (Hafid, dkk., 2011).

Penelitian lainnya yang telah dilakukan terkait tanaman yang berada pada satu famili (*Asteraceae*) yaitu senyawa artemisinin yang merupakan senyawa seskuiterpen lakton yang dapat digunakan sebagai antimalaria, dimana hemozin malaria dapat dihambat oleh artemisinin. Turunan artemisinin yaitu artesunat juga merupakan seskuiterpen lakton dari tanaman *Arthemisia annua* L. Yang dapat digunakan sebagai antimalaria dengan konsentrasi rendah sebesar 10  $\mu\text{m}$  (Simamora, dkk., 2007).

Tanaman yang berada pada famili yang sama (*Asteraceae*) memiliki senyawa aktif seskuiterpen lakton, begitupun pada daun bunga matahari yang memiliki senyawa tersebut. Potensi senyawa seskuiterpen lakton yang hingga saat ini digunakan adalah artemisinin dan senyawa turunannya yaitu artesunat yang digunakan sebagai antimalaria (Macias, 1998).

Dugaan senyawa aktif daun bunga matahari juga dibuktikan melalui hewan uji atau secara *in vivo*. Triastutik (2013) melaporkan bahwa ekstrak seskuiterpen fraksi etil asetat daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) memiliki tingkat aktivitas antimalaria terhadap hewan uji dengan persen penghambatan pada hari ke-4 sebesar 72,78 % untuk dosis 0,4 mg/g BB. Hal ini juga didukung oleh penelitian Bayyinah (2012), yang menyatakan bahwa ekstrak diklorometan daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) memiliki tingkat aktivitas antimalaria terhadap hewan uji dengan persen penghambatan pada hari ke-4 sebesar 100 % untuk dosis 0,05 mg/g BB, 0,5 mg/g BB dan dosis 5 mg/g BB.

Penelitian antimalaria secara *in vitro* terhadap *P. falciparum* dari tanaman lain yang sudah dilakukan yaitu pada daun sernai. Tanaman ini berasal dari keluarga *Asteraceae* yang masih satu famili dengan daun bunga matahari. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun sernai adalah senyawa terpenoid. Ekstrak metanol dari daun sernai menunjukkan aktivitas sebagai antiplasmodium pada kultur 32 jam dengan nilai *Inhibition Concentration* (IC<sub>50</sub>) sebesar 5,253 µg/ml (Rinindar, dkk., 2013).

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antimalaria dari daun bunga matahari terhadap hewan uji terinfeksi *P. berghei* atau secara *in vivo* telah dilakukan dan terbukti memiliki persen penghambatan yang tinggi sebagai antimalaria, sedangkan untuk pengujian secara *in vitro* pada *P. falciparum* strain 3D7 menggunakan ekstrak metanol dan fraksi etil asetat belum ditemukan. Oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan sampel daun bunga matahari yang diuji secara *in vitro* menggunakan parasit *P. falciparum*.

Penggunaan pelarut metanol bertujuan agar senyawa seperti alkaloid, asam amino, polihidrosisteroid, dan saponin dapat terikat pada pelarut polar. Kepolaran suatu pelarut dapat ditunjukkan melalui pengukuran konstanta dielektrum (D) suatu pelarut tersebut. Pelarut metanol mempunyai konstanta dielektrum yang tinggi yakni sebesar 32,6 (Riguera, 1997), sedangkan senyawa seperti hidrokarbon, asam lemak dan terpen dapat terikat oleh senyawa non polar seperti pelarut etil asetat dengan konstanta dielektrum (D) sebesar 6,0.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini menggunakan sampel kering daun bunga matahari. Pemisahan senyawa metabolit sekunder menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol p.a. Sebagian ekstrak yang diperoleh dilakukan partisi dengan pelarut etil asetat. Ekstrak kasar metanol dan fraksi etil asetat yang diperoleh dilakukan uji antimalaria secara *in vitro* terhadap parasit *P. falciparum* strain 3D7. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui aktivitas ekstrak metanol dan fraksi etil asetat tanaman daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) sebagai antimalaria serta kandungan senyawa yang terdapat didalamnya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu :

1. Bagaimana aktivitas antimalaria antara ekstrak metanol dan fraksi etil asetat pada parasit *P. falciparum* strain 3D7 ?
2. Apakah ada perbedaan rata-rata antara hasil ekstrak metanol dan fraksi etil asetat menurut uji Anova?

3. Senyawa apa saja yang terdapat pada fraksi etil asetat daun bunga matahari menggunakan instrumen *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC-MS) ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan penelitian tersebut, maka tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui aktivitas antimalaria antara ekstrak kasar metanol dengan fraksi etil asetat pada parasit *P. falciparum* strain 3D7.
2. Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata antara hasil ekstrak metanol dan fraksi etil asetat menurut uji Anova.
3. Untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat daun bunga matahari menggunakan instrumen UPLC-MS.

### 1.4 Batasan Masalah

Berdasarkan tujuan penelitian di atas agar pembahasan tidak menyimpang, maka penulis menentukan batasan masalah sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan adalah daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) yang diperoleh dari daerah Temas, Kota Batu
2. Parasit yang digunakan adalah *Plasmodium falciparum* strain 3D7
3. Uji antimalaria menggunakan metode Trager dan Jensen
4. Identifikasi senyawa aktif dengan menggunakan instrumen UPLC-MS

### 1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dalam penelitian ini adalah :

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai pemanfaatan tanaman daun bunga matahari bagi kesehatan
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang fraksi etil asetat yang dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat antimalaria



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanaman Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.)

##### 2.1.1 Deskripsi Umum

Bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) termasuk dalam famili *Compositae* yang berasal dari Amerika Utara. Bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) berhabitus perdu dan memiliki kelenjar-kelenjar minyak. Tanaman ini bersifat protandus yaitu benang sari terlebih dahulu sebelum putiknya, sehingga tanaman ini dibudidayakan dengan cara penyilangan antar varietas dengan bantuan serangga penyerbuk (Ceccarinia, 2004). Daun bunga matahari ditampilkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.)

##### 2.1.2 Klasifikasi

Menurut Ceccarinia (2004), bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	:	<i>Plantae</i>
Divisio	:	<i>Magnoliophyta</i>
Classis	:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclassis	:	<i>Asterid</i>

Ordo	:	<i>Asterales</i>
Famili	:	<i>Asteraceae (Compositae)</i>
Genus	:	<i>Helianthus</i>
Spesies	:	<i>Helianthus annuus Linnaecus</i>

### 2.1.3 Morfologi

Bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) merupakan tanaman herba annua (umumnya pendek, kurang dari setahun), tumbuh tegak, berbulu, dengan tinggi 1,5-6 m, batang herbaceous, diameter batang 2,5-7,5 cm biasanya tanpa cabang, tetapi kadang-kadang bercabang pada ujungnya. Daun berbentuk alternatus, kedua permukaan kasar, dan tepi daun bergerigi dengan tangkai daun panjang 5-25 cm dan lebar 2-3 cm. Daun tunggal yang berwarna hijau muda sampai hijau tua, tumbuh berselang-seling berhadapan pada batang (Simpson, dkk., 1986).

Bunga matahari biasanya terdiri atas satu bunga dalam setiap batang dan terletak pada ujung batang. Bunga besar seperti mangkok, diameter 10-50 cm dengan mahkota bunga berjumlah 40-80, berwarna kuning terang dengan bunga pinggir berwarna coklat atau hitam. Biji terdiri atas kulit biji, testa, daging biji dan kotiledon. Kulit biji biasanya berwarna hitam atau kelabu dengan strip (bilur) hitam atau coklat dan umumnya ditanam pada halaman dan taman-taman yang cukup mendapatkan sinar matahari dan biasanya yang digunakan sebagai tanaman hias (Simpson, dkk., 1986).

### 2.1.4 Kegunaan

Berdasarkan Ipteknet (2011), menyebutkan bahwa seluruh bagian tanaman dari bunga matahari dapat digunakan, selain itu penyimpanannya pun sangat mudah yaitu dengan cara dikeringkan. Adapun manfaat dari masing-masing

bagian bunga matahari diantaranya, bagian bunga untuk menurunkan tekanan darah tinggi, mengurangi rasa nyeri pada sakit kepala, pusing, sakit gigi, nyeri menstruasi (*dysmenorrhoe*), nyeri lambung (*gastric pain*), radang payudara (*mastitis*), reumatik (*arthritis*), sulit melahirkan. Bagian biji untuk menambah nafsu makan bertambah, menghilangkan lesu, disentri berdarah, merangsang pengeluaran rash (kemerahan) pada campak, dan sakit kepala. Bagian akar berfungsi untuk mengobati infeksi saluran kencing, radang saluran nafas (*bronchitis*), batuk rejan (*pertussis*), keputihan (*leucorrhoe*), dan bagian daun berfungsi sebagai antimalaria.

#### **2.1.5 Kandungan Senyawa Kimia**

Kandungan senyawa kimia daun bunga matahari adalah pada bagian daun mengandung senyawa seskuiterpen lakton, monoterpen, diterpen, alkaloid dan fenol (Ceccarinia, 2004). Bagian bunga mengandung senyawa triterpen dan saponin. Bagian biji mengandung senyawa tanin, polifenol dan asam lemak (Spring, dkk., 1982).

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Haniah, dkk., (2012) menunjukkan bahwa identifikasi ekstrak metanol daun bunga matahari menggunakan metode KLT, instrumen spektrofotometer UV-Vis dan FTIR diperoleh senyawa triterpenoid. Hal ini diperkuat dengan penelitian Triastutik (2013) yang menunjukkan bahwa hasil ekstrak metanol daun bunga matahari positif mengandung senyawa terpenoid, seskuiterpen, triterpen dan steroid, sedangkan ekstrak fraksi etil asetat daun bunga matahari positif mengandung senyawa terpenoid, seskuiterpen, dan triterpen.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Hariati (2003), tanaman paitan yang masih satu famili dengan tanaman daun bunga matahari yaitu *Compositae*, telah dilaporkan bahwa senyawa dari fraksi metanol bunga paitan memberikan hasil uji positif terhadap uji golongan seskuiterpen lakton. Tanaman *Artemisia annua* L. yang juga masih satu famili dengan daun bunga matahari dan tanaman paitan, memiliki kandungan senyawa *Artemisinin* yang mempunyai struktur seskuiterpen lakton. Senyawa seskuiterpen lakton ini mempunyai peranan penting dalam membunuh parasit malaria (Hafid, dkk., 2011).

## **2.2 Malaria**

### **2.2.1 Deskripsi Malaria**

Malaria adalah suatu penyakit protozoa dari genus *Plasmodium* ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina (Zein, 2004). Malaria berasal dari bahasa Italia, *mala* yang berarti buruk dan *aria* yang berarti udara. Jadi malaria dapat didefinisikan sebagai penyakit infeksi dengan demam berkala yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Berbeda dengan nyamuk biasa yaitu *Culex*, nyamuk ini khususnya menggigit pada malam hari pada posisi yang khas, yakni dengan bagian belakangnya menuju ke atas (Tjay dan Rahardja, 2000).

Definisi untuk penyakit malaria sendiri menurut *world health organization* (WHO) adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit malaria yang masuk ke dalam tubuh manusia. Penyakit malaria termasuk salah satu penyakit menular yang dapat menyerang semua orang dengan gejala utama demam. Gejala lain

yang ditimbulkan dari penyakit ini diantaranya berupa sakit kepala, nyeri punggung, mual, dan pembesaran limfa (Tjay dan Rahardja, 2000).

Menurut Depkes RI (2008), ada empat spesies *Plasmodium* penyebab malaria pada manusia, yaitu *P. vivax* menyebabkan malaria vivax/tertiana, *P. falciparum* menyebabkan malaria falciparum/tropika, *P. malariae* menyebabkan malaria malariae/quartana dan *P. ovale* menyebabkan malaria ovale. Diantara keempat spesies tersebut, *P. falciparum* yang paling berbahaya sebagai penyebab infeksi akut dan berat bahkan berakibat fatal, karena kemampuannya menyerang eritrosit tua dan muda dan menyebabkan resiko kematian yang tinggi pada individu non imun.

### 2.2.2 *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* merupakan salah satu organisme penyebab malaria, merupakan jenis yang paling berbahaya dibandingkan dengan *Plasmodium* lain yang menginfeksi manusia, yaitu *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. vivax*. *Plasmodium falciparum* merupakan salah satu spesies penyebab malaria yang paling banyak diteliti. Hal ini karena spesies ini banyak menyebabkan angka kesakitan dan kematian pada manusia, selain itu juga karena dapat ditumbuhkan dalam jangka waktu yang lama secara *in vitro* (Su, 1995).

*Plasmodium falciparum* memiliki genom yang berukuran 22,8 Mb yang tersebar pada 14 kromosom yang masing-masing berukuran sekitar 0,643-3,29 Mb. Jumlah gen yang terdapat dalam kromosom *P. falciparum* adalah sebanyak 5.300 gen yang mengkode berbagai protein (Su, 1995).

Klasifikasi dari *P. falciparum* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Protista*  
Filum : *Apicomplexa*  
Kelas : *Aconoidasida*  
Ordo : *Haemosporida*  
Genus : *Plasmodium*  
Spesies : *Plasmodium falciparum*

Morfologi dari *P. falciparum* fase aseksual dalam hati yaitu :

1. Bentuk skizon

Bentuk dini yang dapat dilihat dalam hati adalah skizon yang berukuran  $\pm 30 \mu$  pada hari keempat setelah infeksi. Bentuk skizon muda *P. falciparum* dapat dikenal dengan mudah oleh adanya satu atau dua butir pigmen yang menggumpal. Bila skizon sudah matang, akan mengisi kira-kira  $2/3$  eritrosit, akhirnya membelah dan membentuk 8 sampai 24 morozoit yang memiliki jumlah rata-rata adalah 16.

2. Bentuk trophozoit

Trophozoit muda berbentuk cincin (sitoplasma) mulai tidak beraturan/tidak sempurna, trophozoit tua (inti dan sitoplasma) yang tidak teratur.

3. Bentuk gametosit

Gametosis muda berbentuk agak lonjong, kemudian menjadi lebih panjang atau berbentuk elips, akhirnya mencapai bentuk khas seperti sabit atau pisang sebagai gametosis matang. Gametosis untuk pertama kali tampak dalam darah tepi setelah beberapa generasi mengalami skizogoni biasanya kira-kira 10 hari setelah parasit pertama kali tampak dalam darah. Gametosis betina atau makrogametosis biasanya lebih langsing dan lebih panjang dari gametosit jantan.

### 2.2.3 Penyebaran Malaria

Penyakit malaria merupakan penyakit yang endemis di Indonesia. Penyakit ini sering dikaitkan dengan perubahan iklim, selain itu peningkatan suhu juga menyebabkan terbukanya peluang daerah baru sebagai endemik penyakit tersebut. Adanya pemanasan global, nyamuk yang menjadi vektor tersebut mampu untuk berkembang biak di daerah yang sebelumnya dianggap terlalu dingin untuk perkembangbiakannya yaitu isotherm 16 °C lintang utara dan lintang selatan dan pada ketinggian kurang dari 1000 m (Harijanto, dkk., 2009).

Kelima dari parasit *Plasmodium* yang bisa menginfeksi manusia terdistribusi di tempat geografis yang berbeda. *Plasmodium falciparum* paling sering ditemui di Afrika Sub-Sahara dan Melanesia; *Plasmodium vivax* pula ditemui di Amerika Sentral, Amerika Selatan, Afrika Utara, Timur Tengah, dan subkontinen India; *Plasmodium ovale* ditemui hampir di seluruh dunia walaupun terkonsentrasi di Afrika dan *Plasmodium knowlesi* yang sejak dewasa ini didokumentasi di beberapa kepulauan Bornea serta di beberapa daerah Asia Tenggara (Harijanto, dkk., 2009).

### 2.2.4 Siklus Hidup *Plasmodium*

Siklus hidup semua spesies parasit malaria pada manusia adalah sama, yaitu mengalami stadium yang berpindah dari vektor nyamuk ke manusia dan kembali ke nyamuk lagi. Siklus hidup *Plasmodium* terdiri dari siklus seksual (*sporogoni*) yang berlangsung pada nyamuk *Anopheles* dan siklus aseksual yang berlangsung pada manusia. Siklus pada manusia terdiri dari fase eritrosit (*erythrocytic schizogony*) dan fase yang berlangsung di dalam parenkim hati (*exo- erythrocytic schizogony*) (Depkes RI, 2008).

Adapun jenis siklus hidup *Plasmodium falciparum* yaitu:

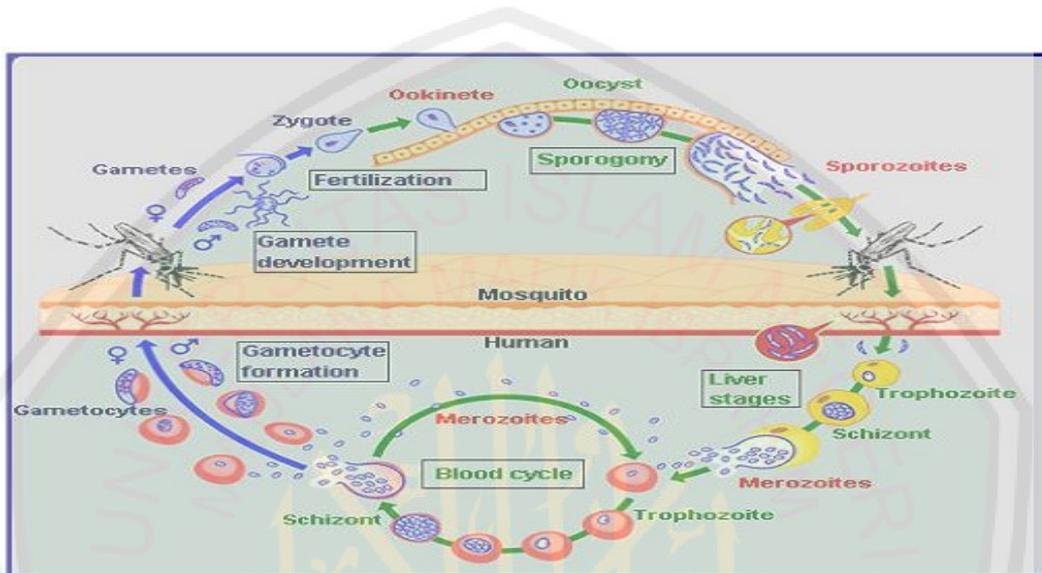
1) Siklus Seksual

Siklus seksual terjadi dalam tubuh nyamuk. Jika nyamuk *Anopheles* betina mengisap darah manusia yang mengandung parasit malaria, parasit bentuk seksual masuk ke dalam perut nyamuk. Bentuk ini mengalami pematangan menjadi mikrogametosit dan makrogametosit, yang kemudian terjadi pembuahan membentuk zigot (ookinet), selanjutnya ookinet menembus dinding lambung nyamuk dan menjadi ookista. Jika ookista pecah, ribuan sporozoit dilepaskan dan bermigrasi mencapai kelenjar air liur nyamuk. Pada saat itu sporozoit siap menginfeksi manusia.

2) Siklus Aseksual

Nyamuk *Anopheles* betina ketika menggigit manusia dan memasukkan sporozoit yang terdapat dalam air liurnya ke dalam sirkulasi darah manusia, maka hanya dalam waktu 30 menit sampai 1 jam sporozoit masuk kedalam sel parenkim hati dan berkembang biak membentuk skizon hati yang mengandung ribuan merozoit. Proses ini disebut *intrahepatic schizogony* atau *pre-erythrocyte schizogony* atau skizogoni eksoeritrosit, karena parasit belum masuk ke dalam eritrosit (sel darah merah). Lamanya fase ini berbeda-beda untuk tiap spesies *Plasmodium*, butuh waktu 5,5 hari untuk *P. falciparum* dan 15 hari untuk *P. malariae*. Akhir fase terjadi proses sporulasi, dimana skizon hati pecah dan banyak mengeluarkan merozoit ke dalam sirkulasi darah. Sporozoit pada *P. vivax* dan *P. ovale* membentuk hipnozoit dalam hati yang dapat bertahan sampai bertahun-tahun atau dikenal sebagai sporozoit “tidur” yang dapat mengakibatkan

relaps pada malaria, yaitu kambuhnya penyakit setelah tampak mereda selama periode tertentu. Siklus hidup parasit malaria ditampilkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Siklus hidup parasit malaria (Gandahusada, 1998)

### 2.2.5 Antimalaria

Pemberantasan terhadap penyakit malariasemakin sulit karena ditemukannya kasus resistensi parasit terhadap obat antimalaria seperti klorokuin (CQ) dan sulfadoksin-primetamin (SP) hampir seluruh provinsi di Indonesia. Menurut lembaga molekuler Eijkman, hampir 100 % parasit malaria di Indonesia telah mengalami mutasi gen dan kebal terhadap klorokuin, selain itu 30-100 % kebal terhadap sulfadoxinprimetamin (Tarigan, 2007). Kasus resistensi ini juga ditemukan di daerah Sabang (Baird, dkk., 1996).

Baru-baru ini derivat *Artemisinin* seperti *Artesunat* dan *Artceter* telah diperkenalkan dan menunjukkan efektifitas antimalaria terutama pada *P.*

*falciparum* yang resisten terhadap obat antimalaria, namun hasil pengamatan terhadap induksi obat dan hubungan antara dosis dengan neurotoksisitas dalam hewan dikhawatirkan keamanannya (Muchtadi dan Haryoto, 2005). Hasil penelusuran pustaka menunjukkan bahwa 10 senyawa yang mempunyai struktur kimia seperti alkaloid, terpenoid, kuinonoid dan fenolik mengandung zat aktif sebagai antiprotozoa. Senyawa-senyawa kimia ini dilaporkan telah diuji keaktifannya baik secara *in vitro* maupun *in vivo* pada hewan percobaan (Simanjuntak, 1995).

#### 2.2.6 Klasifikasi dan Jenis Obat Malaria

Hampir semua obat malaria yang dikembangkan bekerja dengan menghambat atau mematikan bentuk aseksual parasit yang berada dalam eritrosit manusia (skizontosida darah) yang menimbulkan gejala klinis. Obat malaria yang efektif dan bekerja cepat diantaranya klorokuin, kina, kinidin, meflokuin, atovakon, dan derivat *Artemisinin*. Obat-obat lain seperti proguanil, pirimetamin, sulfonamid, sulfon dan antibiotik yang berkhasiat sebagai obat malaria (tetrasiklin, doksisisiklin, dan lain-lain) bekerja lambat dan kurang efektif. Berdasarkan cara kerjanya obat malaria dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Harijanto, dkk., 2009) :

1. Skizontosida darah

Obat golongan ini bekerja pada bentuk aseksual parasit dalam eritrosit dengan menghambat skizogoni sehingga bermanfaat untuk penyembuhan klinis maupun terapi supresif, misalnya klorokuin, kina, kuinidin, meflokuin, piperakuin, derivat *Artemisinin*.

## 2. Skizontosida jaringan

Obat golongan ini bekerja dengan menghambat atau mengeliminasi bentuk primer plasmodium ekstra-eritrositik dalam hati, misalnya proguanil yang bekerja menghambat bentuk laten *P. vivax* dan *P. ovale* dalam sel hati yang dapat menyebabkan relaps berbulan-bulan sampai bertahun-tahun setelah infeksi awal, contoh obatnya adalah primakuin.

## 3. Gametosida

Obat golongan ini bekerja dengan mematikan bentuk seksual *Plasmodium* sehingga berfungsi menghambat transmisi *Plasmodium* ke vektor, sebagai contoh klorokuin dan kina memiliki efek gametosida terhadap *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae*, sedangkan primakuin memiliki efek gametosida yang paten terhadap *P. falciparum*

## 4. Sporontosida

Obat-obat yang termasuk golongan ini menghambat gametosit dalam darah untuk membentuk ookista dan sporozoit dalam nyamuk *Anopheles*. Obat ini dapat mencegah terjadinya transmisi penyakit malaria dan biasanya dikenal dengan sebutan obat antisorogonik. Contoh jenis obatnya adalah primakuin dan proguanil (Harijanto, dkk., 2009).

### 2.3 Senyawa Aktif Antimalaria

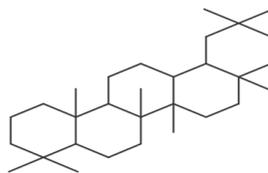
Senyawa antimalaria dari tanaman *Artemisia annua* L. yang berasal dari Cina adalah *Artemisinin* yang dikenal sebagai *qinghaosu* (Tjay dan Rahardja, 2007). Beberapa senyawa metabolit sekunder telah terbukti bermanfaat sebagai

antimalaria diantaranya adalah alkaloid, seskuiterpen, triterpenoid, flavonoid, dan quinon (Saxena, 2003).

### 2.3.1 Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon  $C_{30}$  asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehid, atau asam karboksilat (Harbone, 1987). Triterpenoid berkisar dari senyawa volatil, yakni komponen minyak atsiri yang merupakan monoterrpen dan seskuiterpen ( $C_{10}$ - $C_{15}$ ), senyawa yang kurang volatil yakni diterpen ( $C_{20}$ ), sampai senyawa yang nonvolatil seperti triterpenoid dan sterol ( $C_{30}$ ) serta pigmen karotenoid (Sirait, 2007). Senyawa ini paling umum ditemukan pada tumbuhan berbiji bebas dan sebagai glikosida.

Triterpenoid alkohol monohidroksi dalam tumbuhan tidak bersamaan dengan pigmen, sedangkan triterpanadiol berada bersama-sama dengan karotenoid dan triterpenoid asam dengan flavonoid (Robinson, 1995). Pereaksi Liebermann-Burchard secara umum digunakan untuk mendeteksi triterpenoid menghasilkan warna violet (Harborne, 1987). Struktur senyawa triterpenoid ditampilkan pada Gambar 2.3.

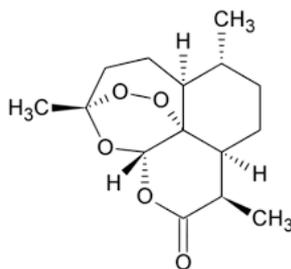


Gambar 2.3 Struktur senyawa triterpenoid (Robinson, 1995)

### 2.3.2 Seskui-terpenoid

Seskui-terpenoid adalah senyawa  $C_{15}H_{24}$  biasanya dianggap berasal dari tiga satuan isoprena. Seskui-terpenoid merupakan senyawa terpenoid yang dibangun oleh 3 unit isoprena yang terdiri dari kerangka unit asiklik atau bisiklik dengan kerangka naftalen. Senyawa terpenoid mempunyai bioaktivitas yang cukup besar, diantaranya sebagai antifeedant, hormon, antimikroba, antibiotik, dan toksin sebagai regulator pertumbuhan tanaman dan pemanis (Harbone, 1987).

Senyawa seskui-terpenoid banyak yang diketahui mempunyai efek fisiologi terhadap hewan dan tumbuhan. Sementara beberapa senyawa seskui-terpenoid ada yang mengandung gugus fungsi lakton yang beracun yang merupakan kandungan tumbuhan obat. Senyawa lain bekerja sebagai penolak serangga dan insektisida, beberapa merangsang pertumbuhan tumbuhan, dan bekerja sebagai fungisida, selain gugus fungsi lakton juga terdapat dua gugus aldehida yang dipisahkan oleh 2 atom karbon. Gugus dialdehida ini menyebabkan beberapa tumbuhan pedas dan juga aktif sebagai penolak serangga. Li, (1979) dan Li, dkk., (1982) telah melakukan isolasi senyawa artemisinin dari tumbuhan *Artemisin* seskui-terpen lakton yang dapat bersifat efektif terhadap penghambatan *P. falciparum* dengan  $EC_{50}$  sebesar 0,42 nm/mL. Struktur senyawa seskui-terpen lakton ditampilkan pada Gambar 2.4.

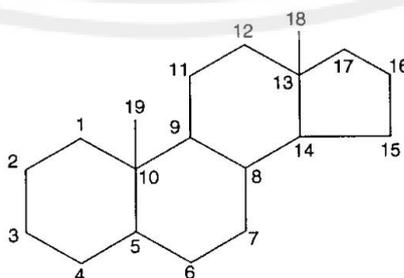


Gambar 2.4 Struktur senyawa seskui-terpen lakton (Robinson, 1995)

### 2.3.3 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung sikloheksana tersebut (Poedjiadi, 1994).

Steroid terdiri atas beberapa kelompok senyawa dan pengelompokan ini didasarkan pada efek fisiologis yang diberikan oleh masing-masing senyawa. Kelompok-kelompok itu adalah sterol, asam-asam empedu, hormon adrenokortikol, aglikon kardiak dan sapogenin. Ditinjau dari segi struktur molekul, perbedaan antara berbagai kelompok steroid ini ditentukan oleh jenis substituen R1, R2, dan R3 yang terikat pada kerangka dasar karbon, sedangkan perbedaan antara senyawa yang satu dengan yang lain pada suatu kelompok tertentu ditentukan oleh panjang rantai karbon R1, gugus fungsi yang terdapat pada substituen R1, R2, R3, dan jumlah serta posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap dan konfigurasi dari pusat-pusat asimetris pada kerangka dasar karbon tersebut (Harbone, 1987). Struktur senyawa steroid ditampilkan pada Gambar 2.5.



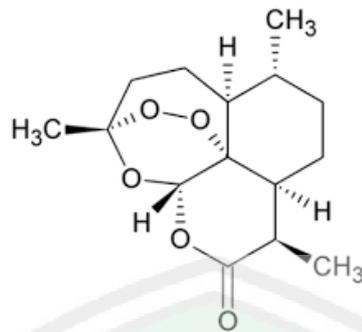
Gambar 2.5 Struktur senyawa steroid (Poedjiadi, 1994)

### 2.3.4 Artemisinin

Senyawa *Artemisinin* (*qinghaosu*) merupakan obat malaria yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* L. Tanaman tersebut mengandung golongan metabolit sekunder yaitu seskuiterpen lakton dengan ikatan peroksida. Obat ini mempunyai efek skizontisida darah yang paling cepat dibandingkan dengan obat malaria lainnya. Aryanti, dkk., (2006) melaporkan bahwa *Artemisinin* termasuk golongan terpenoid seskuiterpen lakton endoperoksida dengan rumus molekul  $C_{15}H_{22}O_5$ .

Mekanisme penghambatan *Plasmodium* oleh *Artemisinin* yaitu melalui penghambatan enzim PfATP6 yaitu enzim yang mirip dengan enzim ATPase yang tersebar di dalam sitoplasma. *Artemisinin* yang terbungkus dalam gelembung membran akan masuk ke dalam sel parasit kemudian diaktifkan oleh ion besi dekat enzim PfATP6 dalam retikulum endoplasma yang terlibat dalam reaksi reduksi hemiatalis yang menghasilkan senyawa sitotoksik. Senyawa ini mengikat dan menghambat PfATP6 secara *irreversible* dan spesifik.

Penelitian Ariyanti, dkk., (2006) menyebutkan uji daya terhadap *A. annua* L. menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> plasmodium pada konsentrasi 0,28 µg/ml. Ini menandakan bahwa fraksi *A. annua* L. sangat efektif membunuh *Plasmodium* dibandingkan dengan kontrol positif sulfadoksin-primetamin konsentrasi 300 µg/ml sebanding dengan *A. annua* L. konsentrasi 100 µg/ml. Struktur senyawa artemisinin ditampilkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur senyawa *Artemisinin* (Poedjadi, 1994)

## 2.4 Metode Pemisahan Senyawa Aktif Daun Bunga Matahari

### 2.4.1 Teknik Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan satu atau beberapa bahan dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Ekstraksi juga merupakan proses pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (*solvent*) sebagai *separating agen*. Pemisahan terjadi atas dasar kemampuan larut yang berbeda dari komponen-komponen dalam campuran. Persyaratan untuk mengekstraksi bahan kandungan tumbuhan adalah ukuran partikel yang cocok dari material awal, semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaan yang terkena cairan ekstraksi akan semakin besar (Octavia, 2009).

Serbuk dengan ukuran yang kecil kemungkinan sel-sel yang rusak juga semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut. Partisi merupakan proses pemisahan zat terlarut di dalam dua macam zat pelarut yang tidak saling bercampur atau dengan kata lain perbandingan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut organik dan pelarut air. Partisi merupakan metode pemisahan yang paling sederhana yang paling banyak digunakan sebagai tahap awal pemurnian ekstrak dan memberikan pemisahan

yang sangat baik, terutama untuk senyawa-senyawa yang memiliki kelarutan yang berbeda (Octavia, 2009).

Proses maserasi dengan menggunakan berbagai macam pelarut akan menembus dinding sel dan akan masuk ke dalam rongga sehingga komponen bioaktif akan larut. Adanya perbedaan konsentrasi antara larutan komponen bioaktif di dalam sel dengan di luar sel maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali hingga terjadi keseimbangan antara larutan di luar dengan di dalam sel (Nur dan Adijuwana, 1989).

Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik suatu pelarut, maka semakin polar pelarut tersebut. Prinsip kelarutan yang dipakai pada metode ini adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar (Khopkar, 2003). Tingkat polaritas pelarut yang digunakan dalam penelitian dirangkum dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Tingkat polaritas pelarut

<b>Pelarut</b>	<b>Titik didih (°C)</b>	<b>Titik beku (°C)</b>	<b>Konstanta Dielektrikum</b>
Metanol	65	-98	32,6
Air	100	0	80,2
Etil asetat	77	-84	6,0

Sumber : Nuriyati, 2013

Hasil ekstrak yang diperoleh akan tergantung pada beberapa faktor, yaitu kondisi alamiah senyawa tersebut, metode ekstraksi yang digunakan, ukuran sampel, lama waktu ekstrak, kondisi dan waktu penyimpanan, serta perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel (Harbone, 1987). Ekstraksi beberapa kali dengan pelarut yang lebih sedikit akan lebih efektif dibanding ekstraksi satu kali dengan semua pelarut sekaligus (Nur dan Adijuwana, 1989). Menurut Riguera (1997), komponen aktif yang dapat diekstrak dari suatu bahan tergantung pada kepolaran pelarut yang digunakan. Senyawa yang terikat pada pelarut polar antara lain alkaloid, asam amino, polihidrosisteroid, dan saponin, sedangkan senyawa yang terikat pada pelarut semi polar antara lain peptida dan depsipectida serta senyawa yang terikat pada pelarut non polar (misalnya heksana) antara lain hidrokarbon, asam lemak, dan terpen.

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol dan etil asetat. Metanol digunakan sebagai pelarut dalam maserasi ini karena metanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik, baik polar maupun non polar dan metanol mempunyai titik didih rendah (65 °C) sehingga mudah diuapkan, sedangkan pelarut etil asetat mempunyai karakteristik yang khas yaitu berbau semerbak, larut dalam kloroform, alkohol, eter dan sedikit larut dalam air dan memiliki rumus molekul  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ .

Triastutik (2013) melakukan penelitian skrining fitokimia tanaman daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) menggunakan ekstraksi dengan pelarut metanol dan dilakukan partisi dengan pelarut etil asetat. Hasil identifikasi golongan senyawa ekstrak metanol yaitu positif terpenoid, seskuiterpen, triterpen

dan steroid, sedangkan untuk fraksi etil asetat positif terpenoid, seskuiterpen, dan triterpen.

#### 2.4.2 Pemekatan Ekstrak Menggunakan *Rotary Evaporator Vacuum*

Ekstrak kasar yang diperoleh dari proses ekstraksi dipekatan menggunakan *rotary evaporator vacuum* dengan tekanan dan temperatur sesuai titik didih pelarut sampai diperoleh ekstrak kering. Akhir ekstraksi diperkirakan sekitar 4-6 jam, labu godok diambil dan ekstrak dituang ke dalam labu alas bulat lalu pelarut diuapkan sampai pekat (Bintang, 2010). Instrumen *rotary evaporator vacuum* ditampilkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Alat *rotary evaporator vacuum* (Bintang, 2010)

*Rotary evaporator vacuum* menggunakan prinsip destilasi. Prinsip utama dalam instrumen ini terletak pada penurunan tekanan uap pada labu alas bulat sehingga pelarut lebih cepat menguap di bawah titik didihnya. Oleh karena itu suatu pelarut akan menguap dan senyawa yang larut dalam pelarut tidak ikut menguap dan tidak rusak oleh suhu tinggi. Penguapan pelarut dapat terjadi karena adanya pemanasan yang dibantu dengan penurunan tekanan pada labu alas bulat

yang dipercepat dengan pemutaran, ketika uap pelarut mengenai dinding kondensor maka pelarut akan mengembun (Bintang, 2010).

## 2.5 Metode Pengujian *In Vitro* pada *Plasmodium falciparum*

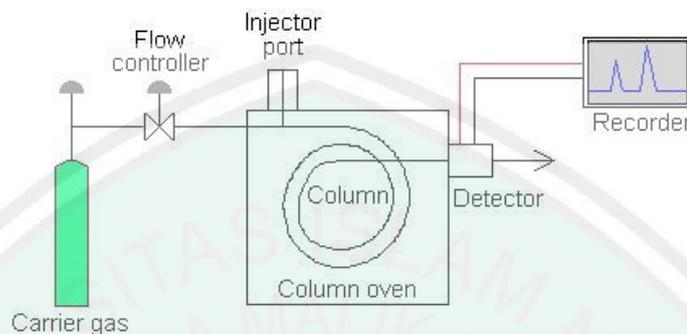
Penelitian daun bunga matahari ini dilakukan dengan menggunakan kombinasi metode Trager dan Jensen. Kultur dari *P. falciparum* terdiri dari sel darah merah dan medium lengkap dengan hematokrit menjadi 5 %. Kultur ini dibiakkan dalam cawan petri yang diletakkan dalam *candle jar*. *Candle jar* beserta isinya diinkubasi pada 37 °C selama 48 jam (Trager dan Jensen, 1976).

## 2.6 Identifikasi Senyawa Aktif dengan UPLC-MS

Instrumen yang digunakan pada sistem kromatografi adalah *LCMS/MS*, yaitu seperangkat *UPLC* yang dihubungkan dengan sistem deteksi *mass spectrometry* (*MS*). Ukuran partikel yang digunakan lebih kecil dibanding sistem *high performance liquid chromatography* (*HPLC*), kecepatan elusi dan kapasitas puncak (jumlah puncak yang dihasilkan per satuan waktu pada pemisahan secara gradien) pada analisis dengan *UPLC* dapat ditingkatkan. Teknologi ini menggunakan kolom yang dikemas dengan partikel yang berukuran lebih kecil atau tingkat aliran tinggi untuk meningkatkan kecepatan dengan resolusi dan sensitivitas yang tinggi (Swartz, 2005).

Instrumen *UPLC* memiliki beberapa bagian penting untuk menjamin tercapainya peningkatan kecepatan, resolusi, dan sensitivitas yang diperoleh dari penggunaan ukuran partikel yang kecil. Dibutuhkan suatu desain khusus pada bagian pompa, *autosampler*, detektor, dan sistem pengolah data untuk memenuhi

tujuan tersebut. Bagian-bagian dasar sebuah instrumen kromatografi cair kinerja ultra ditampilkan pada Gambar 2.8 (Reddy, dkk., 2012).



Gambar 2.8 Instrumentasi LCMS/MS (Asy'Syirban, 2017)

a. Pompa

Pompa kromatografi cair kinerja ultra memiliki kemampuan untuk mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi, yaitu mencapai 18000 psi pada UPLC Eksigent Expert Ultra LC 100 untuk laju alir optimum dengan efisiensi maksimal melewati kolom berukuran 15 cm dengan ukuran partikel 1,7  $\mu\text{m}$ . Pompa UPLC juga memiliki katup *inbuilt solvent selector*, yang memiliki kemampuan untuk mengatur perbandingan fase gerak (hingga 2 macam fase gerak) pada saat pencampuran secara akurat.

b. *Pengelola Sampel*

Sistem UPLC bertujuan untuk menghasilkan kinerja yang dapat diandalkan yaitu stabilitas *needle* (jarum) pada tekanan tinggi. Hal tersebut meminimalkan lebarnya *extra column-band* pada peak yang tajam, dan menghasilkan proses injeksi bebas denyut untuk menjaga kolom dari perubahan tekanan yang

fluktuatif. Proses injeksi dimulai dari katup injeksi yang membelokkan aliran dari jarum injeksi untuk mengambil sampel dari vial. Jarum injeksi masuk ke dalam vial untuk mengambil larutan sampel dengan volume yang tepat sesuai kebutuhan, kemudian jarum injeksi akan kembali lagi ke tempat semula (*injection port*). Jarum akan terdorong melawan permukaan bagian dalam *injection port*, katup injeksi berputar, dan larutan sampel akan terdorong masuk ke *injection port*. Penyebaran (dispersi) sampel dapat diminimalkan dengan menjaga jarak tetap kecil antara *injection port* dan katup injeksi. Setelah proses injeksi sampel selesai, jarum injeksi akan dibilas dengan sejumlah larutan pembilas *needle* dan *syringe* selama waktu tertentu untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi (*carryover*).

c. Kolom

Kolom UPLC terbuat dari partikel-partikel yang berukuran kurang dari 2  $\mu\text{m}$ . Kolom akan ditempatkan pada sebuah bagian yang dapat mengontrol suhu kolom hingga 65 °C.

d. Sumber Ion

Teknik ionisasi pada tekanan atmosfer atau *atmospheric pressure ionization* (API) memperluas jumlah senyawa yang dapat dianalisis dengan LC MS/MS. Molekul analit terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer. Ion-ion analit tersebut kemudian secara mekanis dan elektrostatis terpisah dari inti molekul. Instrumen MS ditampilkan pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Skema spektrometer massa (Budiyanto, 2009)

Teknik ionisasi tekanan atmosfer umumnya adalah:

- 1) Ionisasi elektro spray (*Electro Spray Ionization/ESI*)
- 2) Ionisasi kimia tekanan atmosfer (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization/APCI*)
- 3) Fotoionisasi tekanan atmosfer (*Atmospheric Pressure Photo Ionization/APPI*).

## 2.7 Metode Probit

Metode probit merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menentukan *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ). Nilai  $IC_{50}$  dihitung berdasarkan metode probit, maka harus memiliki tabel probit dalam menentukan nilai probit dari persen penghambatan untuk  $IC_{50}$  untuk setiap kelompok uji. Persamaan garis linear dapat ditentukan bila frekuensi (% respon) efek yang ditimbulkan dihubungkan dengan dosis (konsentrasi) dalam skala logaritma, kemudian akan diperoleh kurva sigmoid yang menyerupai. Bagian tengah kurva yaitu antara 16-84 % respon cukup proporsional (lurus) untuk memperkirakan efek hubungan

dosis (konsentrasi) versus respon efek farmakologi ( $IC_{50}$ ). Sejumlah individu atau spesies yang homogen peningkatan dosis zat toksik (zat uji) yang diberikan akan diikuti oleh peningkatan respon (Priyanto, 2010).

## 2.8 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan semua yang ada di dunia ini tiadalah yang sia-sia, mulai dari yang kecil sampai besar. Semua ciptaan Allah SWT tersebut dapat dimanfaatkan oleh manusia jika manusia itu berfikir. Salah satu ciptaan Allah SWT yang dapat memberikan banyak manfaat untuk manusia adalah tumbuhan. Tumbuhan merupakan benda hidup yang tumbuh dan terdapat di alam semesta. Al Quran banyak menyebutkan tentang tumbuh-tumbuhan untuk dimanfaatkan oleh manusia, sebagaimana Firman Allah SWT dalam QS. Thaha (20): 53.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً  
فَأَخْرَجْنَا بِهَآءِ آزْوَآجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى

Artinya: “ Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam (QS. Thaha (20): 53)”.

Menurut Shihab (2000) dalam tafsir al Mishbah menyatakan bahwa aneka tumbuhan dengan berbagai jenis, bentuk dan rasanya itu merupakan hal yang sungguh menakjubkan lagi membuktikan betapa agung pencipta-Nya. Setiap macam tumbuhan diciptakan Allah SWT untuk kemaslahatan umat manusia, diantaranya sebagai salah satu sumber pangan bagi manusia dan dapat dipetik

hasilnya untuk memenuhi kebutuhan manusia. Manfaat tumbuhan salah satunya dapat digunakan sebagai tanaman obat.

Umat Islam diperintahkan dalam Al Quran untuk mempelajari setiap kandungan ayat ataupun surat yang diturunkan untuk manusia, karena di dalamnya terkandung pengetahuan yang luar biasa terhadap segala sesuatu yang telah diciptakan Allah SWT untuk manusia, termasuk alam semesta. Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuhan mulai dari tumbuhan tingkat tinggi sampai tingkat rendah dan dibalik penciptaan-Nya tersimpan banyak manfaat yang dapat kita ambil darinya, karena tidak ada sesuatu yang diciptakan Allah SWT itu sesuatu yang sia-sia, sekecil apapun ciptaan-Nya pasti memiliki manfaat bagi kelangsungan hidup manusia.

Salah satunya adalah daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) yang merupakan bagian dari jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Hal di atas didukung dengan Firman Allah SWT dalam QS. Asy Syu'araa (26): 7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. asy Syu'araa (26): 7).

Ayat di atas menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap obyek yang disifati-Nya. Tumbuhan yang baik merupakan tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup termasuk tumbuhan yang dapat digunakan sebagai pengobatan. Tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya dan dapat digunakan sebagai obat berbagai penyakit ini merupakan anugerah Allah SWT yang harus dipelajari dan

dimanfaatkan sebaik-baiknya, tidak terkecuali tanaman bunga matahari. Kitab Shahih al Bukhari dan Muslim dari 'Atha, dari Abu Hurairah, ia berkata bahwa, Rasulullah SAW bersabda :

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: ”Setiap penyakit pasti ada obatnya. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya, maka dia akan sembuh dengan seizin Allah SWT” (HR. Muslim).

Hadits tersebut mengandung makna bahwa pada dasarnya setiap penyakit yang diturunkan oleh Allah SWT sudah tentu ada obatnya, dan kita diperintahkan untuk berobat dengan segala sesuatu yang dapat menyembuhkan selama itu bukan bersumber dari barang yang haram. Rasulullah SAW juga memberikan nasihat serupa mengenai beberapa obat lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa Rasulullah SAW menegaskan pentingnya penggunaan tanaman obat, sehingga suri teladan Rasulullah ini perlu diteladani oleh umat-umatnya.

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai Oktober 2016. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pengujian antimalaria dilakukan di Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, dan pengujian senyawa aktif dilakukan di Badan Reserse Kriminal Polri Jakarta Timur.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat pembiakan parasit dan pengujian antimalaria, seperangkat peralatan gelas, mikroskop (Nikon *eclipse* E100), oven (memmert), *magnetic stirrer*, sentrifuse (*hettich* EBA 20), *vortex type* 16700, Bunsen, ruang *Laminar Air Flow*, incubator CO<sub>2</sub> (WTE binder), shaker (*Cimarec* 2), pinset, *waterbath* (*Buchi heating bath* B-490) ultrasonik (BRANSON 3510), neraca analitik, *Rotatory Evaporator merk Eylea N1000*, dan instrumen UPLC-MS.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan- bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L) yang diperoleh dari desa Temas, Kota

Batu. Pelarut metanol p.a, etil asetat p.a, protozoa *P. Falciparum* strain 3D7, rosewell parla memorial institute (RPMI) 1640 yang mengandung L-glutamin, asam N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etana sulfonat (HEPES), DMSO (*Dimetil Sulfoxide*), NaHCO<sub>3</sub> 5 %, antibiotik gentasimin sulfat injeksi, serum, minyak imersi, plasma darah dan sel darah merah (RBC) golongan darah O yang berasal dari PMI Surabaya, zat antikoagulan sitrat fosfat dektrosa (CPD), pewarna giemsa, HCl 2 N, kiesel gel 60 GF E merck, kloroform, serbuk magnesium, akuades, dan larutan bufer fosfat pH 7,2.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Sampel yang digunakan adalah seluruh bagian daun bunga matahari yang kemudian dicuci, dikeringkan dan dihaluskan dalam bentuk serbuk. Serbuk sampel ini diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat metanol dipartisi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Hasil partisi tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* dan selanjutnya dilakukan uji fitokimia. Uji fitokimia golongan senyawa terpenoid, seskuiterpen, triterpen dan steroid dilakukan untuk ekstrak metanol dan fraksi etil asetat. Hasil ekstrak maserasi dan partisi diujikan secara *in vitro* pada parasit *P. falciparum*. Ekstrak terbaik yang mampu menurunkan derajat parasitemia selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa aktif menggunakan instrumen UPLC-MS.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- 1) Preparasi sampel
- 2) Ekstraksi maserasi dan partisi daun bunga matahari
- 3) Uji skrining fitokimia
- 4) Pengujian antimalaria secara *in vitro*
- 5) Identifikasi senyawa aktif menggunakan instrumen UPLC-MS
- 6) Analisis data

### 3.5 Prosedur Kerja

#### 3.5.1 Preparasi Sampel

Sampel tanaman bunga matahari diambil bagian daun kemudian dicuci dengan air kemudian dipotong kecil-kecil. Potongan daun bunga matahari dikeringkan di dalam suhu 27-37 °C, kemudian dihaluskan dengan menggunakan ayakan 60 mesh.

#### 3.5.2 Ekstraksi Maserasi dan Partisi Daun Bunga Matahari

Serbuk sampel sebanyak 200 g dibagi menjadi dua dengan hasil akhir ekstrak pekat digabung menjadi satu. Tahap pertama, serbuk ditimbang sebanyak 100 g sebanyak 2 kali. Tahap kedua merupakan tahap maserasi dengan memasukkan masing-masing 100 g sampel ke dalam erlenmeyer 500 mL. Selama proses perendaman, dilakukan pengadukan selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm menggunakan *shaker*. Sampel disaring dengan bantuan corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh ditampung pada botol yang

telah disiapkan. Residu yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer kembali dan diremaserasi sampai diperoleh filtrat berwarna pucat.

Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh lalu ditimbang dan dihitung randemennya, kemudian dilakukan partisi menggunakan pelarut etil asetat. Tahap awal proses partisi yaitu ekstrak pekat metanol sebanyak 10 g dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 mL. Ekstrak dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 50 mL etil asetat kemudian dikocok. Ditunggu hingga terjadi pemisahan antara dua pelarut. Diambil larutan fraksi atas sebagai fraksi etil asetat dan diambil fraksi bawah untuk dilakukan repartisi menggunakan pelarut yang sama. Fraksi etil asetat yang sudah dikumpulkan menjadi satu lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Ditimbang ekstrak pekat fraksi etil asetat dan dihitung randemennya.

### 3.5.3 Uji Skrining Fitokimia

Metode uji skrining fitokimia merupakan metode analisis kualitatif yang digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam satu bahan. Ekstrak metanol dan fraksi etil asetat dilakukan uji fitokimia senyawa terpenoid, seskuiterpen, triterpen, dan steroid.

#### 3.5.3.1 Uji Terpenoid

Ekstrak hasil maserasi dan partisi daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) diambil sedikit kemudian ditambahkan 2 mL kloroform. Ditambahkan 3 mL

asam sulfat secara perlahan hingga terbentuk lapisan berwarna. Warna merah kecoklatan menunjukkan positif terpenoid (Trease dan Evans, 2002).

### 3.5.3.2 Uji Seskuiterpen

Ekstrak hasil maserasi dan partisi daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) diambil sedikit kemudian dilarutkan dalam petroleum eter. Diuapkan hingga kering, dan ekstrak pekat yang dihasilkan ditambah dengan pereaksi vanilin 10 % dalam asam sulfat. Hasilnya adalah larutan yang menghasilkan warna-warna (Farnsworth, 1996).

### 3.5.3.3 Uji Triterpen/Steroid

Ekstrak hasil maserasi dan partisi daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) diambil masing-masing 5 mg. Dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 0,5-1 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Jika terbentuk warna biru sampai hijau, menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya senyawa triterpen (Auterhoff dan Kovar, 1987).

## 3.5.4 Prosedur Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro*

### 3.5.4.1 Pencairan Parasit

1. Parasit beku *Plasmodium* dicairkan pada suhu 37 °C. Parasit beku yang telah mencair, dipindahkan ke dalam tabung *falcon* 15 mL dan disuspensikan dengan

NaCl 3,5 % (dengan volume yang sama) secara perlahan (*drop by drop*) sambil dicampur dan didiamkan 5-10 menit.

2. *Sentrifuge* dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C dan supernatan dibuang.
3. Endapan (pelet) disuspensikan dengan medium tidak lengkap (3-4 kali volume endapan), dicampur perlahan dan *disentrifuge* dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C dan supernatan dibuang.
5. Sebanyak 4,5 mL medium lengkap dan 0,5 mL RBC 50 % ditambahkan (kadar hematokrit 5 %) setelah endapan dicuci, kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri, dimasukkan ke dalam *candle jar* dan diinkubasi dalam inkubator yang bersuhu 37 °C.

#### 3.5.4.2 Pemantauan Kultur

*Patridish* berisi darah terinfeksi parasit diletakkan dengan posisi miring kemudian media diambil secara hati-hati dengan mikropipet. Medium baru ditambahkan sesuai dengan volume medium yang dibuang. Pertumbuhan kultur (parasetimia) dapat dilihat dengan dibuat hapusan darah tipis (*thin smear*) terlebih dahulu. Jika parasetimia lebih dari 4 % maka dilakukan subkultur, namun jika masih rendah medium diganti setiap hari dan setiap 2 hari dilakukan RBC 50 %.

#### 3.5.4.3 Sinkronisasi Parasit

1. Kultur parasit pada *patridish* dipindahkan ke *falcon* 15 mL dan *disentrifuge* 1500 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang.

2. Endapan (eritrosit terinfeksi *Plasmodium*) disuspensikan dengan sorbitol 5 % sebanyak 3-4 kali volume endapan dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar.
3. *Sentrifuge* dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C, kemudian supernatan dibuang.
4. Endapan dicuci dengan medium tak lengkap (3-4 kali volume) dan disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali.
5. Medium lengkap dengan RBC 50 % ditambahkan setelah endapan dicuci. Kultur dimasukkan ke dalam *candle jar* dan diinkubasi dalam inkubator yang bersuhu 37 °C.

#### 3.5.4.4 Persiapan Suspensi Parasit

Parasitemia suspensi parasit untuk uji antimalaria secara in vitro adalah  $\pm 1$  % dan hematokrit 5 %. Suspensi sel parasit tersebut dibuat dari biakan *P. falciparum* yang telah disinkronisasi.

#### 3.5.4.5 Persiapan Bahan Uji

Sebanyak 10 mg bahan uji dilarutkan dalam 100  $\mu\text{L}$  Dimetil Sulfoksida (DMSO) (larutan stok). Larutan stok tersebut selanjutnya diencerkan dengan media lengkap sehingga diperoleh konsentrasi 0,01; 0,1; 1; 10; dan 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Pembuatan larutan uji dilakukan secara aseptik.

### 3.5.4.6 Uji Aktivitas Antimalaria

Sampel	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	Kontrol Negatif
S <sub>1</sub> a	1 	2 	3 	4 	5 	
S <sub>1</sub> b	6 	7 	8 	9 	10 	
S <sub>2</sub> a	11 	12 	13 	14 	15 	
S <sub>2</sub> b	16 	17 	18 	19 	20 	

Gambar 3.1 Pola sumur uji (*plat well* 24)

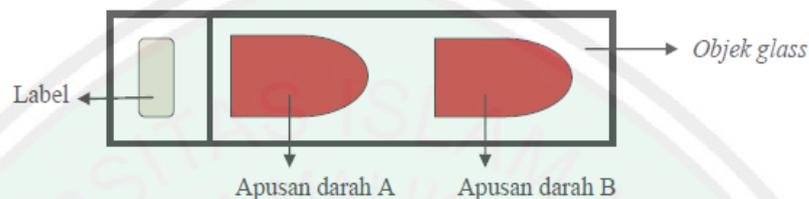
Keterangan :

- D<sub>1</sub> = konsentrasi 100 µg/ml; D<sub>2</sub> = 10 µg/ml; D<sub>3</sub> = 1 µg/ml; D<sub>4</sub> = 0,1 µg/ml; D<sub>5</sub> = 0,01 µg/ml
- S<sub>1</sub>a = sampel 1; S<sub>1</sub> b = duplikat dari S<sub>1</sub>a
- S<sub>2</sub>a = sampel 2; S<sub>2</sub> b = duplikat dari S<sub>2</sub>a

Sebanyak 500 µL suspensi parasit yang berasal dari stok dengan tingkat parasitemia  $\pm 1$  % dan hematokrit 5 % dimasukkan dalam *plat well* yang ditampilkan pada Gambar 3.1. Setelah itu pada *mikroplate* 1-5 masing-masing *well* ditambahkan dengan 500 µL bahan uji dengan berbagai dosis sesuai dengan pola yang telah ditentukan, sedangkan pada *well* 6 diisi dengan 500 µL suspensi parasit dan 500 µL medium lengkap. *Plat well* dimasukkan dalam *candle jar* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Langkah selanjutnya supernatan pada *well* dibuang dan pelet dibuat sediaan hapusan darah tipis. Sediaan dikeringkan pada suhu kamar, difiksasi dengan metanol selama  $\pm 1-5$  detik dan dikeringkan kembali. Hapusan yang sudah kering diwarnai dengan giemsa 15 % dan dibiarkan selama  $\pm 10$  menit, dicuci dengan air

dan dikeringkan. Sediaan hapusan darah tipis diperiksa menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000 kali. Parasit malaria ditandai dengan inti berwarna merah dan plasma berwarna biru sedangkan sel darah merah berwarna merah muda.



Gambar 3.2 Pola pembuatan apusan darah tipis

Persentase kematian dihitung dengan cara membandingkan antara jumlah ring, trophozit, skizon hidup terhadap 1000 aseksual parasit *P. falciparum*, kemudian perhitungannya dibandingkan dengan kontrol negatif (Maximus, 2005). Setelah didapatkan % parasitemia, kemudian dihitung % pertumbuhan dan % penghambatannya.

### 3.6 Identifikasi Senyawa Menggunakan UPLC-MS

Sampel fraksi etil asetat dianalisis menggunakan UPLC-MS. Sampel yang digunakan sebanyak 5  $\mu$ L. Spektra yang dihasilkan lalu dianalisa untuk mengetahui kemungkinan senyawa-senyawa yang terdapat di dalamnya. Tahap awal merupakan tahap preparasi eluen untuk UPLC. Eluen disaring terlebih dahulu dengan menggunakan saringan nilon berdiameter 1,7  $\mu$ m dengan bantuan pompa vakum, kemudian tahap selanjutnya adalah penyuntikan sampel pada UPLC. Sampel diambil sebanyak 5  $\mu$ L dan disuntikkan secara langsung

menggunakan *micro syringe* kedalam eluen yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom. Tahap terakhir yaitu identifikasi senyawa dengan MS yang dilakukan dengan menghubungkan system UPLC dengan sumber ion ESI.

Alat yang digunakan pada proses pemisahan adalah UPLC *Alliance 2695* dengan *photodiode-array* (PDA) dan detektor 2996. Jenis kolom yang digunakan adalah *Acquity C18* dengan ukuran 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1x50 mm yang memiliki kecepatan alir 0,3 mL/min, injeksi 5  $\mu\text{L}$ . Adapun eluen yang digunakan ada 2 macam yaitu  $\text{H}_2\text{O}$  (UPLC *grade*) + asam format dan asetonitril + asam format serta menggunakan metode isokratik dengan perbandingan 30 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 % asam format, dan 70 % asetonitril.

Alat yang digunakan untuk MS mempunyai jenis XEVO–G2QTOF dengan analisis *time of flight* (TOF) dengan *electrosprayer* modus positif (ES+) dan negatif (ES-) dari m/z 100 sampai m/z 2000. Adapun untuk *desolvation temperature* 300 °C, *source temperature* 110 °C dan *desolvation gas flow* 500 L/hour.

### 3.7 Analisis Data Menggunakan Metode Probit

Persentase penghambatan dihitung dengan membandingkan parasitemia senyawa uji dengan kontrol. Aktivitas antimalaria dinyatakan dalam  $\text{IC}_{50}$  yang diperoleh dengan menganalisis hubungan antara konsentrasi senyawa uji dengan persentase penghambatan dengan metode probit program *statistical package for the social sciences* (SPSS) (Priyanto, 2010).

## BAB IV

### PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian daun dari tanaman daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). Tahap pertama, daun bunga matahari sebanyak 2 kg diambil dan dicuci untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun agar tidak mengganggu proses ekstraksi. Seluruh bagian daun ditiriskan agar sisa air hasil pencucian dapat kering.

Tahap kedua, daun dikeringkan menggunakan oven pada suhu 27-37 °C. Pengerinan pada suhu kamar bertujuan agar senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya tidak rusak. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama, tidak mudah rusak, dan komposisi senyawa metabolit sekunder juga tidak mengalami perubahan. Kadar air yang tinggi dalam suatu bahan dapat mendorong enzim melakukan aktivitasnya mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain yang tidak mungkin lagi memiliki efek farmakologi seperti senyawa aslinya (Pramono, 2004).

Daun bunga matahari yang telah kering diperoleh sebanyak 200 g dan berwarna hijau kecoklatan yang sebelumnya berwarna hijau tua. Daun kering ini dihaluskan menggunakan mesin giling agar diperoleh sampel yang berukuran halus dengan permukaan yang cukup luas sehingga akan mempermudah proses ekstraksinya, selanjutnya dilakukan pengayakan dengan ayakan berukuran 60

mesh, artinya dalam 1 inci ayakan terdapat 60 lubang di dalamnya. Tujuan dilakukan proses ayakan agar sampel memiliki ukuran partikel tepat atau sama dengan 60 mesh. Serbuk daun bunga matahari yang telah diayak ditampilkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Serbuk daun bunga matahari dengan ayakan 60 mesh

Semakin kecil ukuran suatu partikel maka semakin besar luas permukaannya sehingga interaksi antara partikel dengan pelarut ekstraksi akan menjadi semakin besar (Brady, 1999). Semakin besar kontak antara partikel dengan pelarutnya, maka kemungkinan rusaknya dinding sel akan semakin besar sehingga memudahkan terikatnya senyawa metabolit sekunder dari sampel pada pelarut tertentu. Serbuk yang diperoleh sebanyak 200 g dan ditempatkan pada wadah tertutup dengan diberikan silika gel di dalamnya, tujuannya agar meminimalisir kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme maupun penguraian oleh enzim.

#### 4.2 Ekstraksi Maserasi dan Partisi Daun Bunga matahari

Tahap maserasi diawali dengan pembagian serbuk sampel sebanyak 200 g menjadi dua dengan hasil akhir ekstrak pekat digabung menjadi satu. Mula-mula serbuk ditimbang sebanyak 100 g sebanyak 2 kali. Tujuan pembagian sampel dalam dua wadah adalah untuk memperoleh hasil ekstraksi yang maksimal. Tahap kedua merupakan tahap maserasi dengan memasukkan masing-masing 100 g sampel ke dalam erlenmeyer 500 mL.

Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi adalah metanol. Metanol memiliki sifat polar, karena umumnya senyawa metabolit pada tanaman terikat dalam bentuk glikosida, yang berikatan dengan suatu gula sehingga senyawa metabolit dalam tanaman bersifat polar, selanjutnya sampel direndam pada masing-masing erlenmeyer dengan 300 mL pelarut metanol selama 24 jam. Ekstraksi maserasi dilakukan dengan pelarut yang memiliki kepolaran tertentu sehingga dapat mengekstrak senyawa yang dikehendaki sesuai kepolarannya. Prinsip yang digunakan adalah "*like dissolved like*" (Brady, 1999). Perendaman menggunakan pelarut metanol ditampilkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Proses perendaman (maserasi)

Selama proses perendaman, dilakukan pengadukan selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm menggunakan *shaker*. Perlakuan tersebut bertujuan untuk membantu banyaknya kontak antara pelarut dengan sampel sehingga akan mempercepat proses ekstraksi secara konstan, selanjutnya sampel disaring dengan bantuan corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh ditampung pada botol yang telah disiapkan. Residu yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer kembali dan diremaserasi sampai diperoleh filtrat berwarna pucat. Proses penyaringan menggunakan corong *buchner* ditampilkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Proses penyaringan menggunakan corong *buchner*

Pucatnya filtrat dapat dianggap bahwa semua senyawa yang berbobot molekul rendah telah terekstrak (Harbone, 1987). Perubahan warna yang terjadi pada filtrat adalah dari hijau kehitaman menjadi hijau pucat. Jumlah pelarut metanol yang digunakan untuk maserasi adalah 1800 mL. Filtrat gabungan hasil maserasi dari pelarut metanol selanjutnya dipekatkan untuk memperoleh ekstrak pekat metanol. Pemekatan dilakukan dengan bantuan *rotary evaporator vaccuum*.

Kepekatan dari suatu ekstrak ditandai dengan pelarut yang tidak menetes lagi sehingga proses pemekatan dapat dihentikan. *Rotary evaporator vaccuum* adalah instrumen yang menggunakan prinsip destilasi (pemisahan). Prinsip utama dari instrumen tersebut terletak pada penurunan tekanan pada labu alas bulat sehingga pelarut dapat menguap di bawah suhu titik didihnya. Pemekatan filtrat dengan *rotary evaporator vaccuum* ditampilkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Pemekatan filtrat dengan *rotary evaporator vaccuum*

Instrumen *rotary evaporator vaccuum* lebih sering digunakan karena mampu menguapkan pelarut di bawah titik didihnya sehingga zat yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu tinggi. Penguapan terjadi karena adanya pemanasan yang dipercepat oleh putaran dari labu alas bulat dan adanya pompa vakum yang dapat menurunkan tekanan pada labu alas bulat. Uap pelarut akan naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi cairan pelarut kembali yang kemudian ditampung dalam labu alas bulat penampung. Ekstrak pekat metanol diperoleh sebanyak 16,78 g dengan persen rendemennya adalah 8,39 %.

Ekstrak kasar metanol yang diperoleh selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Prinsip metode ekstraksi cair-cair didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling campur (Khopkar, 2003). Sebelum proses partisi dilakukan, ekstrak kasar metanol dilarutkan dengan air terlebih dahulu. Hal ini dikarenakan adanya tingkat kepolaran antara metanol dan etil asetat yang hampir sama, sehingga diperlukan pelarut universal berupa air untuk memperjelas pemisahan antar kedua pelarut.

Tahap awal proses partisi yaitu ekstrak pekat metanol sebanyak 10 g dilarutkan dengan air sebanyak 50 mL. Selanjutnya ekstrak dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 50 mL etil asetat kemudian dikocok. Pengocokan tersebut bertujuan untuk memaksimalkan kontak antara pelarut dengan ekstrak pekat metanol, sehingga senyawa polar dan semi polar/non polar akan terikat kepada masing-masing pelarut sesuai dengan tingkat kepolarannya. Bila telah terjadi pemisahan antara kedua pelarut maka fraksi atas dan bawah dikeluarkan secara bergantian. Proses partisi menggunakan etil asetat ditampilkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Proses partisi menggunakan etil asetat

Fraksi atas merupakan ekstrak yang larut dalam etil asetat dan fraksi bawah merupakan ekstrak yang larut dalam metanol-air. Penentuan fraksi bawah dan fraksi atas dilihat dari nilai berat jenis pelarut. Berat jenis metanol adalah 0,7915, untuk air adalah 1 dan 0,902 untuk etil asetat. Perbedaan berat jenis pelarut mengakibatkan pelarut metanol-air lebih besar sehingga berada pada fraksi bawah dan sebaliknya.

Proses selanjutnya adalah repartisi menggunakan pelarut yang sama yaitu etil asetat. Adapun tanda jika senyawa dari ekstrak pekat metanol telah terikat secara keseluruhan pada pelarut etil asetat adalah fraksi atas berupa etil asetat berubah warna menjadi putih bening yang semula berwarna hijau tua. Proses partisi ini membutuhkan pelarut air sebanyak 50 mL dan pelarut etil asetat sebanyak 250 mL. Ekstrak fraksi etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccuum* dan didapatkan berat ekstrak 3,53 g dengan persen rendemen sebesar 35,3 %. Hasil ekstraksi disajikan pada Tabel 4.1 dan perhitungan berat ekstrak pekat dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 4.1 Hasil ekstraksi maserasi dan partisi daun bunga matahari

Proses Ekstraksi	Berat awal sampel (g)	Total volume pelarut (mL)	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/v)
Maserasi	200	Metanol (1800)	Hijau tua pekat	16,78	8,39
Partisi	10	Etil asetat (250)	Hijau tua pekat	3,53	35,3

Kandungan senyawa yang terkandung di dalam daun bunga matahari ditunjukkan dengan berat ekstrak yang diperoleh. Sebagian ekstrak pekat metanol dan fraksi etil asetat akan digunakan untuk uji fitokimia, uji antimalaria secara *in vitro*, dan uji senyawa aktif menggunakan instrumen UPLC-MS.

### 4.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan dalam penelitian ini akan digunakan sebagai acuan penentuan golongan senyawa menggunakan instrumentasi UPLC-MS. Penelitian ini dilakukan 3 pengujian golongan aktif meliputi uji terpenoid, uji triterpenoid/steroid, dan seskuiterpenoid. Alasan pemilihan pengujian tersebut karena dugaan senyawa yang berada di dalamnya adalah golongan terpenoid, sehingga ketiga pengujian tersebut diharapkan mampu mewakili. Hasil identifikasi golongan senyawa dirangkum dalam Tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil pengamatan uji fitokimia

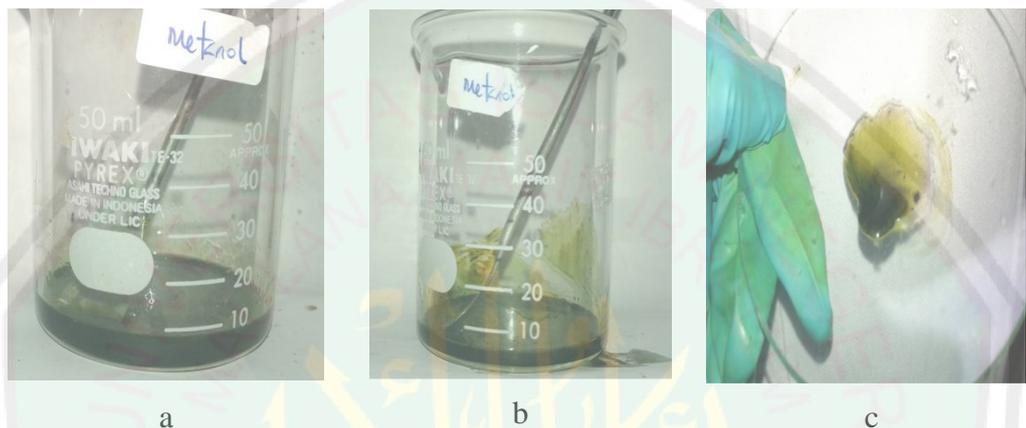
No	Ekstrak	Terpenoid	Seskuiterpenoid	Steroid	Triterpen
1	Metanol	+++	+++	+++	-
2	Fraksi etil asetat	++	++	++	-

Keterangan :

- +++ : kandungan senyawa lebih banyak (warna sangat pekat)
- ++ : Mengandung senyawa (warna cukup pekat)
- : Tidak mengandung senyawa

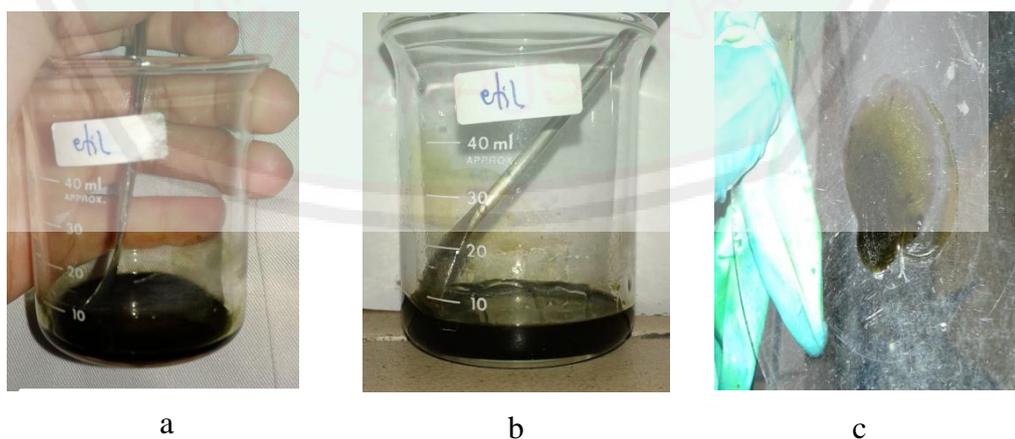
Hasil identifikasi senyawa aktif berdasarkan uji fitokimia pada masing-masing ekstrak ditunjukkan dengan adanya senyawa terpenoid, seskuiterpenoid, steroid, triterpen. Positif terpenoid pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya

warna merah kecoklatan, positif seskuiterpenoid ditunjukkan dengan adanya warna biru kehijauan, dan positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau. Adapun hasil identifikasi senyawa aktif berdasarkan uji fitokimia ekstrak metanol ditampilkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Uji fitokimia ekstrak metanol, (a) Uji terpenoid, (b) Uji steroid, dan (c) Uji seskuiterpen

Adapun hasil identifikasi senyawa aktif berdasarkan uji fitokimia fraksi etil asetat ditampilkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Uji fitokimia fraksi etil asetat, (a) Uji terpenoid, (b) Uji steroid, dan (c) Uji seskuiterpen

Warna hasil uji fitokimia pada ekstrak metanol sangat pekat dan kandungan senyawa yang terdapat di dalamnya masih banyak. Hal ini dikarenakan keseluruhan senyawa yang bersifat polar baik non polar masih berada di dalam ekstrak tersebut, sedangkan untuk fraksi etil asetat menunjukkan warna hasil positif yang cukup pekat. Hal ini dimungkinkan sebagian senyawa yang bersifat semi polar hingga non polar yang terkandung dalam ekstrak metanol telah terikat di dalam etil asetat.

Hasil penelitian ini didukung oleh Bayyinah (2012), mengemukakan bahwa uji fitokimia terhadap ekstrak diklorometan daun bunga matahari yang menunjukkan adanya kandungan senyawa steroid dan seskuiterpen, selain itu Triastutik (2013) menyebutkan bahwa ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun bunga matahari mengandung senyawa terpenoid.

#### 4.4. Uji Antimalaria

Parasit yang digunakan dalam penelitian ini adalah *P. falciparum* strain 3D7. Waktu pengujian  $\pm 48$  jam yang merupakan waktu parasit mengalami satu siklus lengkap yaitu fase aseksual. Hasil pengujian terhadap parasit *P. falciparum* diperoleh dari perhitungan jumlah parasit yang tumbuh dalam sumur uji selama  $\pm 48$  jam. Setelah proses inkubasi selama  $\pm 48$  jam kemudian dibuat slide apusan darah tipis untuk mengetahui jumlah parasit yang terinfeksi yang ditunjukkan pada Gambar 4.8. Pengamatan parasit yang terinfeksi dapat dipermudah dengan pemberian pewarna giemsa yang ditampilkan pada Gambar 4.9.

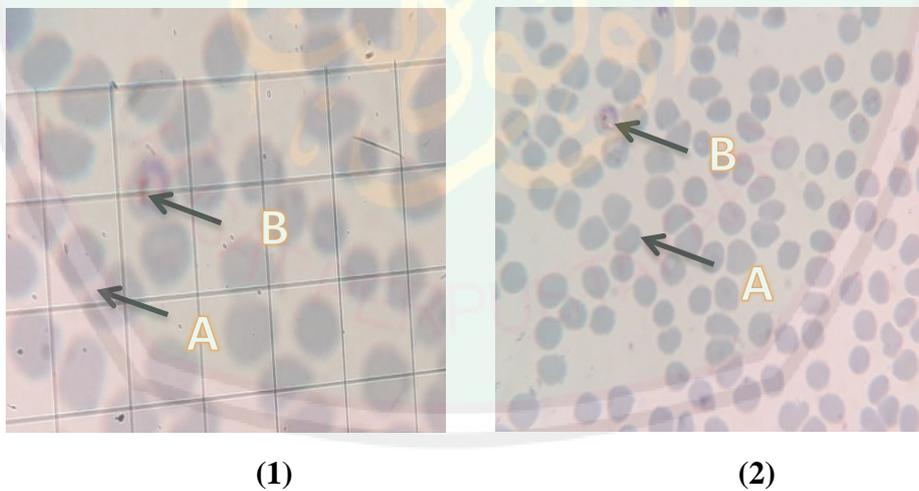


Gambar 4.8 Pembuatan slide apusan darah tipis



Gambar 4.9 Pewarnaan slide dengan giemsa

Jumlah eritrosit terinfeksi dihitung berdasarkan jumlah eritrosit yang dipilih dari beberapa lapang pandang apusan yang monolayer menggunakan mikroskop perbesaran 1000 kali, hasil pengamatan ditampilkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Pengamatan parasit hasil uji antimalaria

Keterangan: (1) Perhitungan menggunakan lapang pandang, (2) Perhitungan tanpa lapang pandang, (A) Sel eritrosit normal dan (B) Sel eritrosit terinfeksi parasit (Dokumentasi pribadi: Badi'ah, 2016).

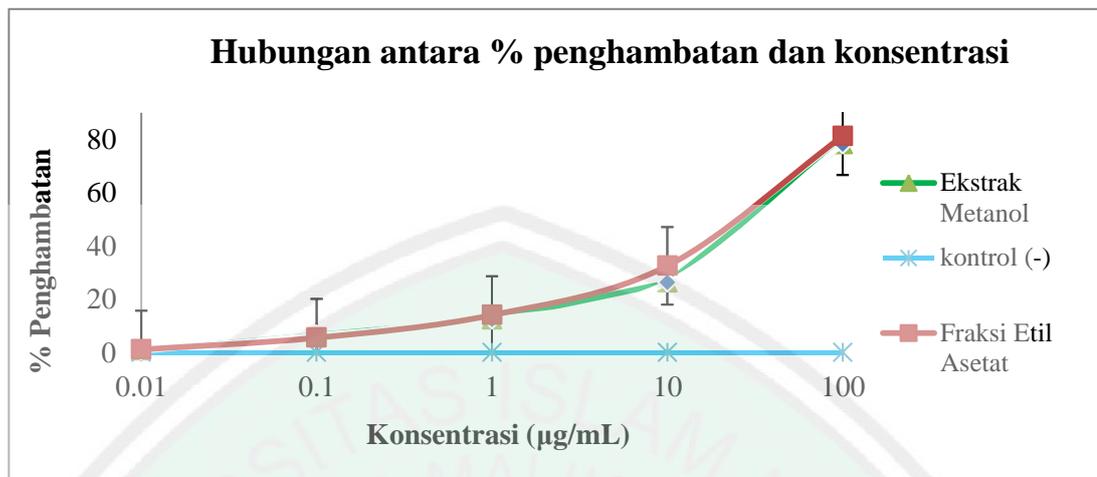
Aktivitas antimalaria dapat diketahui dengan melakukan perhitungan terhadap persen parasitemia yang telah didapatkan pada pengujian sampel, sehingga menghasilkan persen pertumbuhan, penghambatan, dan penghambatan rata-rata, yang dirangkum dalam Tabel 4.3. Data persen penghambatan rata-rata dan log konsentrasi dosis uji yang kemudian dianalisis nilai probitnya sehingga dapat diperoleh hasil  $IC_{50}$ .

Tabel 4.3 Hasil pengujian antimalaria secara *in vitro*

Nama Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	R	% Parasitemia		% Pertumbuhan	% Hambatan	% Hambatan rata-rata	
			0 jam	48 jam				
Ekstrak Metanol	Kontrol (-)	1	1,28	6,14	4,86	-	-	
		2	1,28	6,17	4,89	-		
	100	1	1,28	2,34	1,06	78,19	78,15	
		2	1,28	2,35	1,07	78,12		
	10	1	1,28	4,86	3,58	26,34	26,26	
		2	1,28	4,89	3,61	26,18		
	1	1	1,28	5,53	4,25	12,55	12,41	
		2	1,28	5,57	4,29	12,27		
	0,1	1	1,28	5,81	4,53	6,79	6,67	
		2	1,28	5,85	4,57	6,54		
	0,01	1	1,28	6,11	4,83	0,62	0,72	
		2	1,28	6,13	4,85	0,82		
	Fraksi Etil Asetat	Kontrol (-)	1	1,28	6,14	4,86	-	-
			2	1,28	6,17	4,89	-	
100		1	1,28	2,18	0,90	81,48	81,23	
		2	1,28	2,21	0,93	80,98		
10		1	1,28	4,56	3,28	32,51	32,62	
		2	1,28	4,57	3,29	32,72		
1		1	1,28	5,45	4,17	14,20		
		2	1,28	5,48	4,20	14,11		
0,1		1	1,28	5,87	4,59	5,56	5,64	
		2	1,28	5,89	4,61	5,73		
0,01		1	1,28	6,09	4,81	1,03	1,23	
		2	1,28	6,1	4,82	1,43		

Aktivitas penghambatan menurut Tabel 4.3 menunjukkan bahwa persen penghambatan terbesar ditunjukkan oleh fraksi etil asetat pada konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  sebesar 81,23 %, sedangkan persen penghambatan terendah pada ekstrak metanol sebesar 78,15 %. Nilai persen penghambatan yang telah diperoleh kemudian dianalisis dengan analisa probit untuk menentukan nilai  $\text{IC}_{50}$ . Nilai  $\text{IC}_{50}$  (*Inhibitory Concentration*) ditentukan berdasarkan kurva hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Nilai  $\text{IC}_{50}$  menurut katagori Gessler (1994), mengatakan bahwa aktivitas antiplasmodium zat uji secara *in vitro* terbagi 3 yaitu: zat uji dengan aktivitas paling baik bila nilai  $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$ , aktivitas baik bila nilai  $\text{IC}_{50}$  antara 10-50  $\mu\text{g/mL}$ , dan akitivitas kurang baik bila nilai  $\text{IC}_{50} \geq 50 \mu\text{g/mL}$ . Hal ini membuktikan bahwa sampel fraksi etil asetat mempunyai  $\text{IC}_{50}$  lebih baik yaitu sebesar 16,68  $\mu\text{g/mL}$  dari pada sampel ekstrak metanol yaitu sebesar 22,18  $\mu\text{g/mL}$ .

Hubungan antara konsentrasi masing-masing ekstrak terhadap persen penghambatan yang telah diperoleh dapat disimpulkan melalui grafik yang ditampilkan pada Gambar 4.11. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, maka semakin tinggi pula persen penghambatan dalam membunuh parasit *P. falciparum*.



Gambar 4.11 Grafik hubungan antara persen penghambatan dan konsentrasi

Data yang sudah diperoleh dari uji antimalaria selanjutnya digunakan untuk uji ANOVA yang bertujuan untuk mengetahui hipotesis ada atau tidaknya perbedaan antara 2 sampel tersebut. Sebelum uji Anova dilakukan, maka harus dilakukan uji kesamaan varian (uji homogenitas). Hasil data diperoleh dengan membandingkan taraf signifikansi 0,05 pada sign. Jika sign > 0,05 maka data mempunyai varian yang sama dan sebaliknya. Data yang diperoleh menunjukkan sign > 0,05 yaitu 0,790 > 0,05 (Lampiran 6), sehingga data tersebut mempunyai varian yang sama (homogen) dan dapat dilanjutkan ke tahap uji ANOVA.

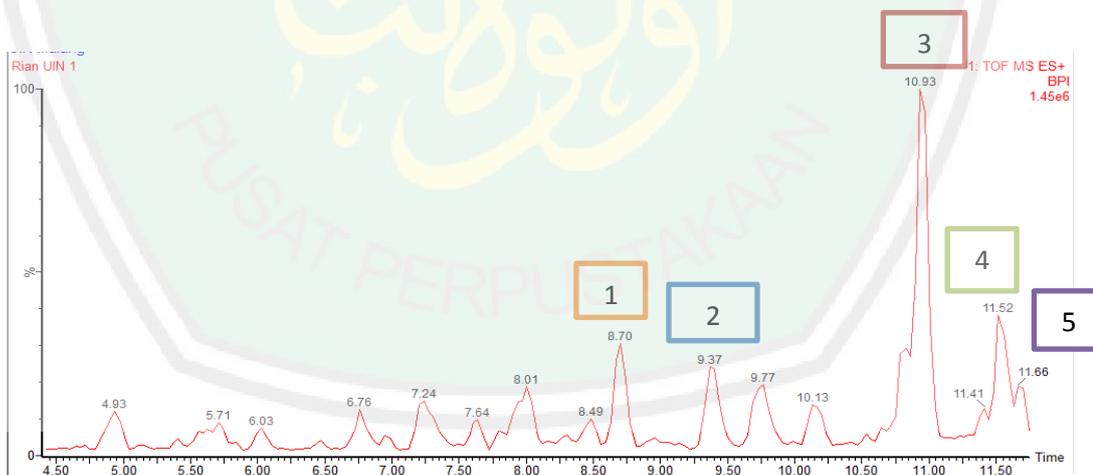
Uji ANOVA dapat ditentukan dengan menggunakan perbandingan nilai F atau nilai probabilitas. Nilai F dapat ditentukan dengan perbandingan antara F hitung dengan F tabel. Hasil yang diperoleh menunjukkan F hitung < F tabel yaitu 0,022 < 4,30 artinya H<sub>0</sub> diterima. Sedangkan untuk nilai probabilitas ditentukan dengan perbandingan taraf signifikansi 0,05 pada sign. Hasil yang diperoleh menunjukkan sign > 0,05 yaitu 0,0882 > 0,05, artinya H<sub>0</sub> diterima. Jika

H<sub>0</sub> diterima, maka menunjukkan tidak ada perbedaan rata-rata antara ekstrak metanol dengan fraksi etil asetat.

Menurut Triastutik (2013), hasil uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* untuk ekstrak fraksi etil asetat mempunyai nilai persen penghambatan terbesar pada dosis 0,4 mg/g BB yaitu 72,78 %. Hal ini dikarenakan adanya dugaan senyawa antimalaria yaitu seskuiterpen. Setelah diketahui ekstrak terbaik dari pengujian antimalaria, selanjutnya dilakukan uji UPLC-MS untuk mengetahui senyawa aktif antimalaria.

#### 4.5 Identifikasi Senyawa dengan UPLC/QToF/MS/MS System

Kromatogram UPLC-MS sampel fraksi etil asetat daun bunga matahari ditampilkan dalam Gambar 4.12.



Keterangan:

TOF MS ES+ menunjukkan adanya analyser MS yang dipakai adalah TOF (*Time of Flight*) dengan *electrosprayer* modus positif (ES+). Angka 1.45e6 menunjukkan bahwa nilai maksimum intensitas sinyal MS (100%) 1.45 kali sepuluh pangkat 6

Gambar 4.12 Kromatogram UPLC-MS hasil pemisahan senyawa sampel fraksi etil asetat daun bunga matahari

Hasil analisis menggunakan UPLC-MS pada Gambar 4.12 menunjukkan terdapat 16 puncak. Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi etil asetat kemungkinan mengandung 16 senyawa. Lima diantaranya diduga merupakan senyawa yang terkandung dalam daun bunga matahari, yang dirangkum dalam Tabel 4.4. Disamping 5 senyawa yang teridentifikasi dalam Tabel 4.4, masih terdapat senyawa-senyawa lain yang ditampilkan dalam data kromatogram pada Gambar 4.12. Senyawa-senyawa tersebut berada pada rentang waktu retensi 4,94-8,49 menit.

Tabel 4.4 Kandungan senyawa yang diduga terkandung dalam daun bunga matahari

No Puncak	Waktu Retensi (min)	Luas Area	Area %	Nama Senyawa
1	8,70	54834	9,80 %	<i>Artemisinin</i>
2	9,37	34341	6,14 %	<i>Heliangolide</i>
3	10,93	179175	32,02 %	<i>Asam Linolenat</i>
4	11,52	42714	7,63 %	<i>Eupalinolide C</i>
5	11,66	37507	4,31 %	<i>Asam Linoleat</i>

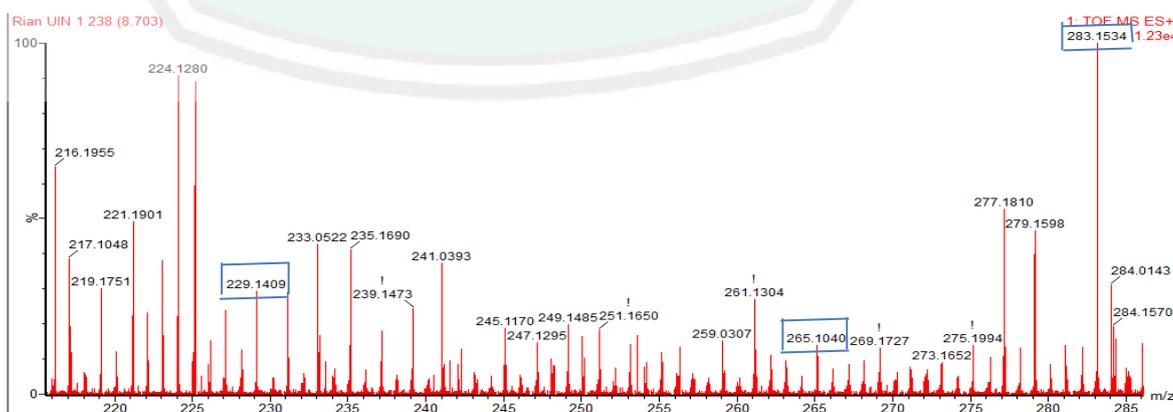
Berdasarkan Tabel 4.4 diasumsikan bahwa senyawa-senyawa yang terdeteksi bersifat kurang polar. Hal ini dapat dilihat dari waktu retensi yang terus meningkat, artinya senyawa-senyawa tersebut masih tertahan dalam fase diam yang bersifat non polar. Adapun puncak nomor 1,2, dan 4 termasuk dalam golongan seskuiterpen (Muti'ah, dkk., 2012) dan puncak no 3 dan 4 termasuk dalam golongan asam tak jenuh (Dewi, dkk., 2014). Semua senyawa tersebut terdapat dalam daun bunga matahari (Muti'ah, dkk., 2012).

Berdasarkan kromatogram pada Gambar 4.12 diduga pada puncak nomor 1 terdapat senyawa *Artemisinin* dengan nilai  $m/z$  283. Puncak nomor 2 terdapat senyawa *Heliangolide* dengan nilai  $m/z$  358. Asam linolenat dengan nilai  $m/z$  278 pada puncak 3. Senyawa *Eupalinolide C* dengan nilai  $m/z$  443 pada puncak 4 dan puncak 5 adalah senyawa asam linoleat dengan nilai  $m/z$  280.

Puncak tertinggi pada Gambar 4.12 merupakan senyawa asam linolenat yang bersifat non polar karena mempunyai rantai karbon yang panjang dan sukar larut dalam air. Perolehan % area yang dimiliki senyawa tersebut adalah 32,02 %, hal ini diduga karena adanya pengikatan senyawa kurang polar sampai non polar yang terikat pada pelarut etil asetat pada saat ekstraksi cair-cair, selain itu faktor besarnya prosentase kandungan senyawa tersebut dalam sampel fraksi etil asetat diduga karena kandungan asam lemak yang ada di dalam biji bunga matahari. Daun yang merupakan bagian dari tanaman bunga matahari juga berpotensi mengandung asam lemak seperti asam linolenat.

Adapun spektra massa dari masing-masing senyawa diketahui sebagai berikut:

### 1. *Artemisinin*

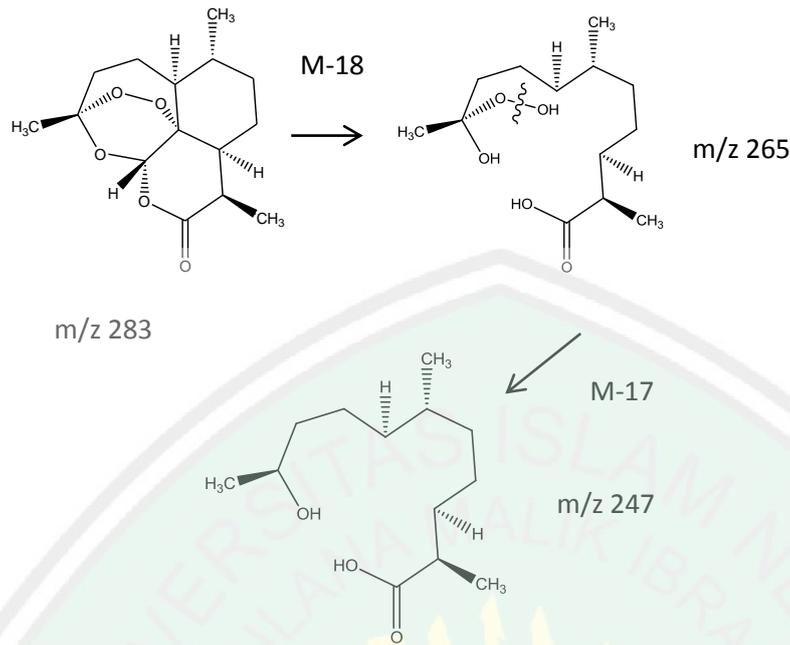


Gambar 4.13 Spektrum massa dari *Artemisinin*

Senyawa *Artemisinin* merupakan kelompok senyawa seskuiterpen lakton yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* L. Struktur dari molekul *Artemisinin* mengandung jembatan peroksida yang dapat membunuh parasit malaria (Teoh, 2006). Senyawa tersebut termasuk dalam famili *Asteraceae* (*Compositae*) yang masih satu famili dengan bunga matahari (*Helianthus annuus* L. ). Diduga karena masih satu famili, maka senyawa *Artemisinin* juga terdapat dalam daun bunga matahari.

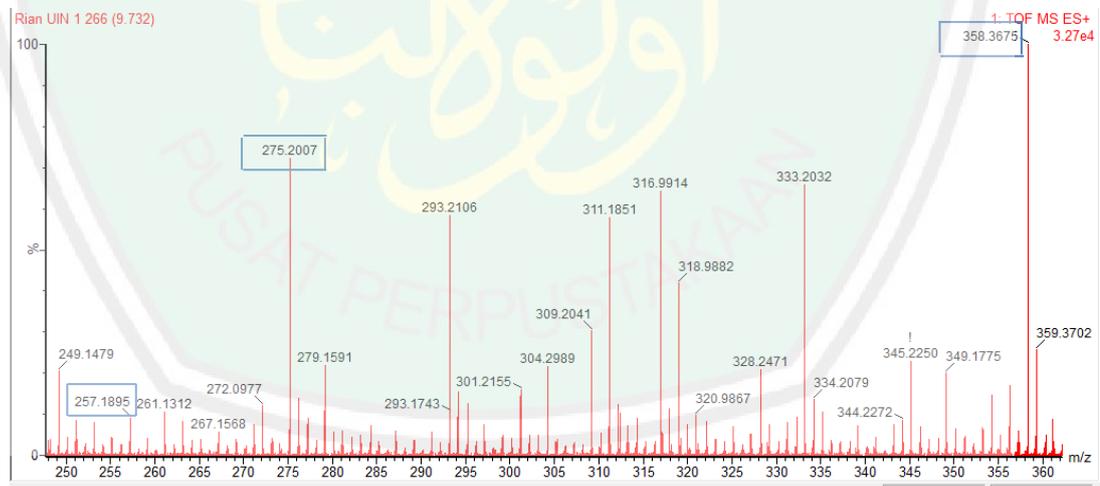
Maggar, dkk., (2013) mengungkapkan bahwa waktu retensi yang dibutuhkan untuk mengidentifikasi senyawa *Artemisinin* menggunakan instrumen *high performance liquid chromatography* (HPLC) adalah 35,2 menit, sedangkan dalam penelitian ini waktu retensi senyawa *Artemisinin* adalah 8,70 menit. Hal ini disebabkan oleh instrumen yang dipakai adalah UPLC dengan ukuran kolom 1,7  $\mu\text{m}/2,1 \times 50$  mm, sehingga lebih cepat dalam pemisahan senyawa dibandingkan HPLC dengan kolom 1,8  $\mu\text{m}/150 \times 4,6$  mm.

Berdasarkan Gambar 4.13, hasil kromatogram senyawa *Artemisinin* memiliki  $m/z$  283. Adapun rumus molekulnya adalah  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_5$  yang terfragmentasi menjadi  $m/z$  265 dengan melepaskan M-18. Selisih antara hasil spektra dengan hasil  $m/z$  diasumsikan melepaskan molekul air ( $\text{H}_2\text{O}$ ), kemudian terfragmentasi menjadi  $m/z$  247 dengan melepaskan gugus hidroksil (OH) dan melepaskan molekul air menjadi  $m/z$  229. (Nieuwerburgh, dkk., 2006). Adapun fragmentasi dari senyawa *Artemisinin* ditampilkan pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Fragmentasi senyawa Artemisinin

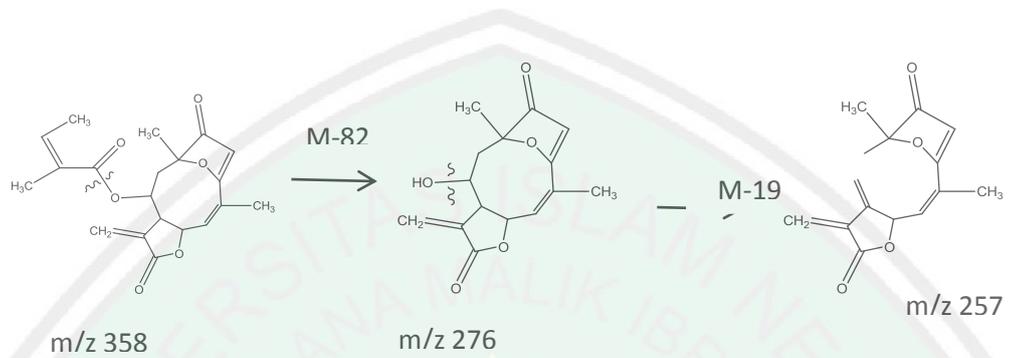
## 2. Heliangolide



Gambar 4.15 Spektrum massa dari Heliangolide

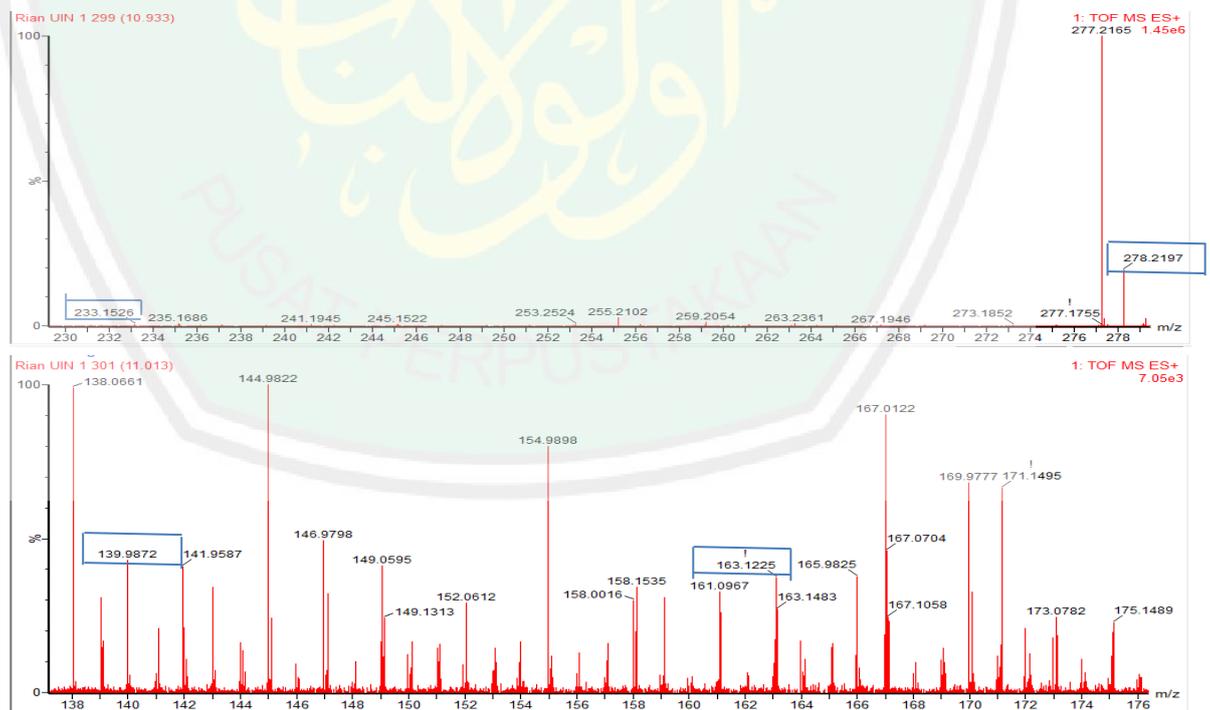
Senyawa *Heliangolide* merupakan senyawa golongan sesquiterpen lakton yang memiliki rumus molekul  $C_{20}H_{22}O_6$  dengan m/z 358. Berdasarkan spektra massa pada Gambar 4.15 menunjukkan intensitas puncak tertinggi pada m/z 358

yang terfragmentasi menjadi  $m/z$  276 dengan pelepasan molekul  $C_2H_5-CCH_3CO$  (M-82), kemudian terfragmentasi menjadi  $m/z$  258 (Spring, 1982). Adapun fragmentasi dari senyawa *Heliangolide* ditampilkan pada Gambar 4.16.



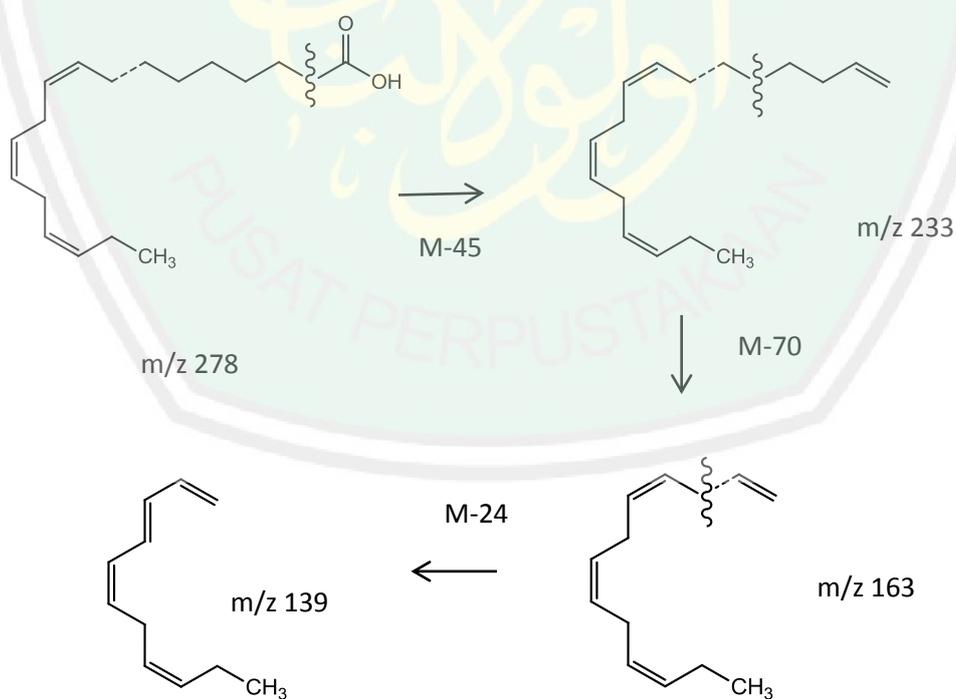
Gambar 4.16 Fragmentasi senyawa *Heliangolide*

### 3. Asam Linolenat



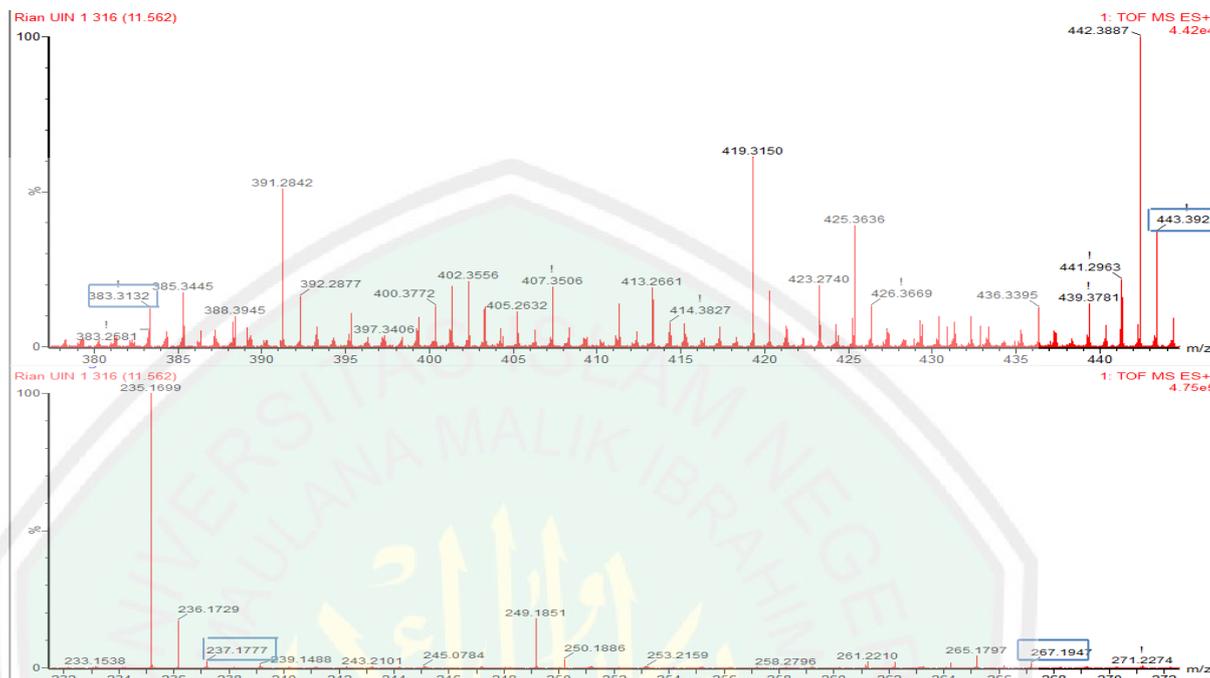
Gambar 4.17 Spektrum massa dari asam linolenat

Asam linolenat merupakan asam lemak tidak jenuh berantai panjang dan tergolong asam lemak esensial. Sifat kepolarannya cenderung non polar karena sukar larut dalam air. Berdasarkan Gambar 4.17, hasil kromatogram senyawa asam linolenat memiliki  $m/z$  278 dengan rumus molekul  $C_{18}H_{30}O_2$ . Fragmentasi awal (M-1) terlepasnya atom hidrogen yang terikat pada gugus karboksilat menjadi  $m/z$  277 dengan intensitas puncak tertinggi, kemudian menjadi  $m/z$  233 dengan pelepasan gugus karboksilat (M-45). Selanjutnya melepaskan 5 molekul  $CH_2$  (M-70) menjadi  $m/z$  163 dan terfragmentasi lagi menjadi 139 dengan hilangnya molekul  $(CH_2)_2$  (M-24) (Dewi, 2014). Adapun fragmentasi asam linolenat ditampilkan pada Gambar 4.18.



Gambar 4.18 Fragmentasi senyawa asam linolenat

#### 4. *Eupalinolide C*

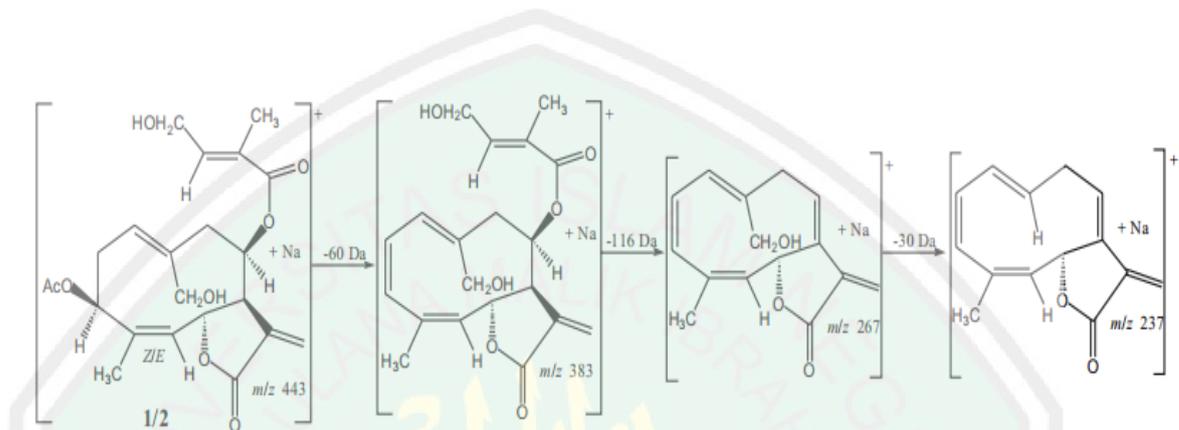


Gambar 4.19 Spektrum massa dari *Eupalinolide C*

Senyawa *Eupalinolide C* merupakan golongan *germacrane seskiterpen lakton* yang diisolasi dari tanaman herbal *Eupatorium lindleyanum* DC. Tanaman tersebut memiliki famili yang sama dengan *Helianthus annuus* L. yaitu *Compositae*, sehingga diasumsikan memiliki kesamaan senyawa dengan tanaman *Eupatorium*. Berdasarkan Yang, dkk., (2009), dalam penelitiannya menyatakan bahwa waktu retensi untuk mengidentifikasi senyawa *eupalinolide C* adalah 13,47 menit, sedangkan dalam peneltian ini hanya 11,52 menit. Hal ini juga didasarkan pada pemakaian instrumen yang berbeda yaitu HPLC dan UPLC.

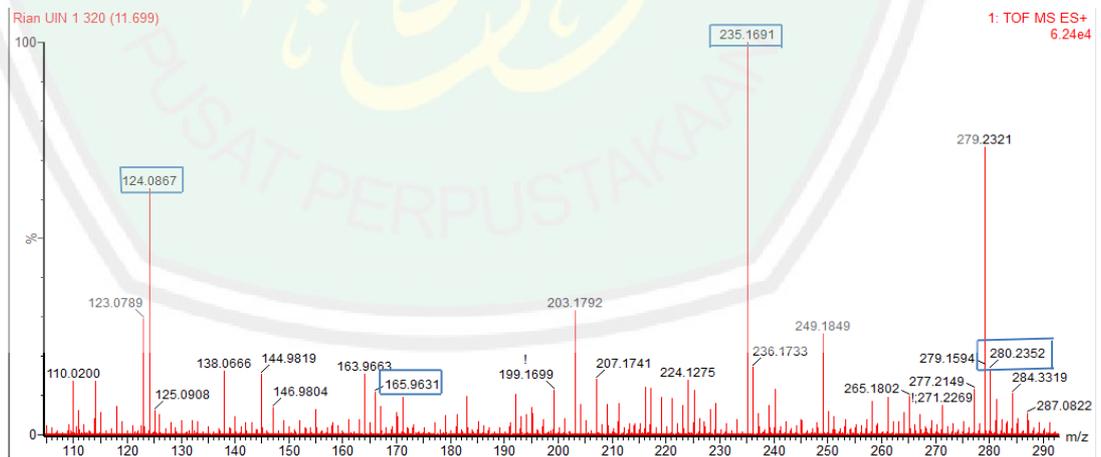
Berdasarkan Gambar 4.19, hasil kromatogram senyawa *Eupalinolide C* memiliki m/z 443, yang terfragmentasi menjadi m/z 383 dengan pelepasan metil asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , M-60), kemudian terfragmentasi menjadi molekul yang lebih

sederhana dengan melepaskan (M-116, HOCH<sub>2</sub>-CH dan C(CH<sub>3</sub>)COOH) menjadi m/z 267 dan m/z 237 dengan melepaskan (M-30, HCHO) (Yang, dkk., 2009). Adapun fragmentasi *Eupalinolide C* ditampilkan pada Gambar 4.20.



Gambar 4.20 Fragmentasi senyawa *Eupalinolide C*

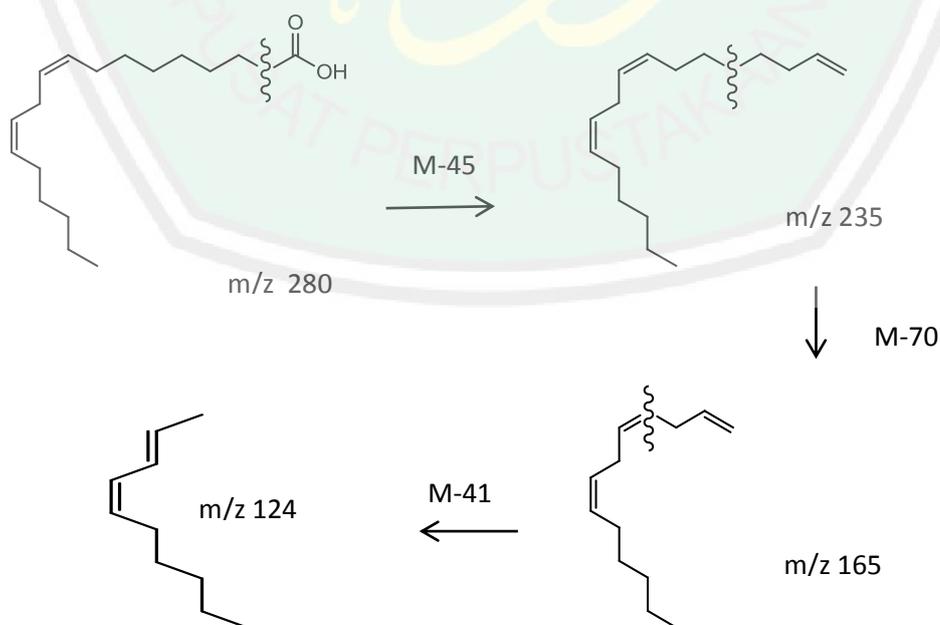
## 5. Asam Linoleat



Gambar 4.21 Spektrum massa asam linoleat

Pemanfaatan bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) selain sebagai tanaman hias juga kaya akan asam linoleat pada bunga dan bijinya. Daun juga merupakan bagian dari tanaman bunga matahari yang dapat memiliki kandungan senyawa yang sama dengan bagian tanaman yang lain, tidak terkecuali asam linoleat walaupun jumlahnya sangat sedikit (Muti'ah, dkk., 2011). Asam linoleat merupakan asam lemak tidak jenuh berantai panjang dan tergolong asam lemak esensial yang serupa dengan asam linolenat.

Berdasarkan Gambar 4.21, hasil kromatogram senyawa asam linoleat memiliki  $m/z$  280 yang terfragmentasi menjadi  $m/z$  235 dengan melepaskan gugus karboksilat (COOH, M-45). Intensitas yang dimiliki puncak  $m/z$  235 merupakan puncak tertinggi yang mewakili fragmen dari asam linoleat, kemudian terfragmentasi kembali dengan melepaskan 5 molekul  $\text{CH}_2$  (M-70) menjadi  $m/z$  165 dan melepaskan  $(\text{CH}_2)_2\text{CH}$  (M-41) menjadi  $m/z$  124 (Dewi, 2014). Adapun fragmentasi asam linoleat ditampilkan pada Gambar 4.22.



Gambar 4.22 Fragmentasi senyawa asam linoleat

#### 4.6 Mekanisme Kerja Senyawa Artemisinin sebagai Antimalaria

Berdasarkan kromatogram fraksi etil asetat daun bunga matahari, terdapat senyawa yang diduga sebagai antimalaria yaitu artemisinin. Senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen lakton yang diekstrak dari tanaman *Artemisia annua* L. Tanaman tersebut memiliki famili yang sama dengan daun bunga matahari yaitu *Asteraceae (Compositae)*. Senyawa ini memberikan efektivitas yang tinggi terhadap strain yang multiresisten dan memiliki sifat skizontosida darah yang cepat dengan waktu paruh  $\pm 2$  jam, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Artemisinin juga mampu menurunkan transmisi malaria di daerah endemis karena bersifat gametosidal (Muti'ah, 2010).

Mekanisme kerja senyawa artemisinin awalnya pada jembatan peroksida, artemisinin diputus oleh ion  $\text{Fe}^{2+}$  (ion besi II) menjadi radikal bebas yang reaktif. Radikal-radikal artemisinin ini kemudian menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam parasit yang mengakibatkan parasit tersebut mati. Sumber ion besi II intrasel adalah heme (komponen penting dalam hemoglobin), selama pertumbuhan dan penggandaannya dalam eritrosit, parasit memakan dan menghancurkan sampai 80 % sel hemoglobin inang dalam vakuola makanan.

Heme akan melepaskan  $\text{Fe}^{2+}$ -hem, teroksidasi menjadi  $\text{Fe}^{3+}$ -hematin, dan kemudian mengendap dalam vakuola makanan membentuk pigmen kristal yang disebut hemozin. Efek antimalaria dari *Artemisinin* disebabkan oleh masuknya molekul ini ke dalam vakuola makanan parasit dan kemudian berinteraksi dengan  $\text{Fe}^{2+}$ -hem. Interaksi menghasilkan radikal bebas yang menghancurkan komponen vital parasit sehingga parasit mati (Simamora, dkk., 2007).

#### 4.7 Pemanfaatan Daun Bunga Matahari dalam Perspektif Islam

Bunga matahari merupakan salah satu tanaman di sekitar kita yang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Hal ini telah dibuktikan dengan hasil penelitian uji aktivitas antimalaria daun bunga matahari yang memiliki potensi besar dalam penghambatan pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum*. Persen penghambatan untuk ekstrak metanol berkisar antara 0,72 % hingga 78,15 % dan fraksi etil asetat berkisar antara 1,23 % hingga 81,23 % (Tabel 4.3). Potensi penghambatan dapat diketahui dengan pengujian *inhibitory concentration* (IC<sub>50</sub>). Nilai IC<sub>50</sub> untuk sampel ekstrak metanol yaitu 22,18 µg/mL dan untuk fraksi etil asetat yaitu 16,68 µg/mL. Hasil identifikasi senyawa dengan reagen dan instrumen LC-MS menunjukkan adanya golongan seskuiterpen lakton.

Rasulullah SAW menggunakan tumbuhan sebagai pengobatan. Beliau telah memberikan petunjuk tentang cara mengobati diri beliau sendiri, keluarganya dan para sahabat yaitu menggunakan tiga jenis obat diantaranya obat alamiah, obat ilahiyah, dan kombinasi obat alamiah dan ilahiyah. Pengobatan alamiah yang digunakan Nabi Muhammad SAW diantaranya kurma betina yang tidak dibuahi, kurma belum matang yang belum dibuahi, rumput rawa, jinten hitam, dan lain-lain, sedangkan pengobatan berdasarkan wahyu Allah SWT tentang apa yang bermanfaat dan tidak berbahaya, misalnya melakukan pengobatan dengan tumbuh-tumbuhan. Berbekal Firman tersebut pencarian tanaman sebagai alternatif pengobatan terus dilakukan.

Ayat Al Quran banyak menerangkan tentang manfaat tumbuh-tumbuhan, walaupun daun bunga matahari tidak dicantumkan secara tersurat dalam Firman-

Nya, namun hal ini nampak jelas pada Firman Allah SWT dalam salah satu QS. Luqman (31): 10.

حَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا  
مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۚ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya : ”Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. Luqman (31): 10).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan dari berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Kata كَرِيم yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 tersebut digunakan untuk mensifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Pasangan tumbuhan yang كَرِيم adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya. Walaupun daun bunga matahari tidak disebutkan dalam Firman tersebut, namun merupakan salah satu jenis tumbuhan yang perlu dipikirkan keberadaannya. Tanaman tersebut juga dapat digunakan sebagai obat berbagai penyakit seperti hadits yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari, Nabi Muhammad SAW bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: ”Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Allah menurunkan pula obatnya” (HR. Bukhari).

Hadits tersebut mengandung makna bahwa pada dasarnya setiap penyakit yang diturunkan oleh Allah SWT sudah tentu ada obatnya dan kita diperintahkan untuk berobat dengan segala sesuatu yang dapat menyembuhkan selama itu bukan

bersumber dari barang yang haram, selain itu pemanfaatan daun bunga matahari sebagai obat merupakan salah satu alat penyembuhan. Sesungguhnya tidak ada yang dapat memberikan kesembuhan dari suatu penyakit kecuali Allah SWT. Allah SWT berfirman dalam QS. asy Syu'araa (26): 80.

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

Artinya: “Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku” (QS. asy Syu'araa (26): 80).

Surat asy Syu'araa ayat 80 tersebut menunjukkan bahwa betapa adilnya Allah SWT memberikan suatu penyakit beserta penawarnya (obat). Pengetahuan yang akan menuntun manusia untuk menemukan obat-obatan yang telah tersedia di alam. Ayat di atas menjelaskan bahwa sebagai seorang muslim dalam mencari kesembuhan dari suatu penyakit melalui pengobatan harus didasarkan kepada aqidah yang besar yakni meyakini bahwa penyembuhan hanya dari Allah SWT sedangkan obat hanya sebagai perantara. Selain dengan obat alamiah, terdapat juga obat ilahiyah seperti dalam Firman Allah SWT dalam QS. ar Ra'd (13): 28, yang menyebutkan bahwa hanya dengan mengingat Allah SWT hati menjadi tenang.

الَّذِينَ ءَامَنُوا وَتَطْمَئِنُّ قُلُوبُهُمْ بِذِكْرِ اللَّهِ أَلَا بِذِكْرِ اللَّهِ تَطْمَئِنُّ الْقُلُوبُ ﴿٢٨﴾

Artinya: “ (yaitu) orang-orang yang beriman dan hati mereka manjadi tenteram dengan mengingat Allah. Ingatlah, hanya dengan mengingati Allah-lah hati menjadi tenteram.(QS. ar Ra'd (13): 28).

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak metanol daun bunga matahari mampu menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* strain 3D7 dengan nilai  $IC_{50}$  22,18  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan fraksi etil asetat dalam menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* strain 3D7 ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  16,68  $\mu\text{g/mL}$ .
2. Hasil uji ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan rata-rata antara ekstrak metanol dengan fraksi etil asetat.
3. Hasil identifikasi senyawa fraksi etil asetat menggunakan UPLC-MS diperoleh 5 puncak tertinggi dengan jenis senyawa yaitu *artemisinin*, *heliangolide*, *asam linolenat*, *eupalinolide C* dan *asam linoleat* pada m/z berturut-turut yaitu 282, 358, 278, 443, dan 280.

#### 5.2 Saran

1. Perlu adanya pegujian ekstrak metanol dengan instrumen UPLC-MS untuk membandingkan senyawa yang terkandung didalamnya dengan fraksi etil asetat.
2. Jika tujuan penelitian berupa pembuatan obat herbal antimalaria, maka disarankan untuk menggunakan sampel ekstrak metanol.
3. Jika tujuan penelitian berupa pengembangan akademik, maka disarankan untuk menguji hasil isolat fraksi etil asetat dengan instrumen UPLC-MS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aryanti, Ermayanti, T.M., Prinadi, K.I., dan Dewi, R.M. 2006. Uji Daya Antimalaria *Artemisia spp*: Terhadap *Plasmodium falciparum*. *Farmasi Indonesia*, 17(2): 81-84.
- Asy'Syirban, F. 2011. Kromatografi Gas dan HPLC. (Online), (<http://fazasyirban.blogspot.co.id/2011/01/kromatografi-gas-dan-hplc.html>), diakses 25 Januari 2017.
- Auterhoff, H., dan Kovar, K.A. 1987. *Identifikasi Obat*. Bandung: ITB.
- Baird, J.K., dkk. 1998. Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax* In Transmigration Settlements of West Kalimantan, Indonesia. *American Society of Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 59(4): 513-518.
- Bayyinah, I. 2012. Identifikasi dan Uji Aktivitas Ekstrak Diklorometan Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Sebagai Antimalaria Secara *In Vivo* Pada Mencit Jantan. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga Gandahusada.
- Brady, J.E. 1999. *Kimia Universitas Asas dan Struktur*. Bandung: Binarupa aksara.
- Budiyanto, J. 2009. *Fisika: Untuk SMA/MA Kelas XII*. Jakarta: Pusat Perbukuan, Departemen Pendidikan Nasional.
- Ceccarinia. 2004. Essential Oil Composition of *Helianthus annuus* L. Leaves and Heads of Two Cultivated Hybrids "Carlos" and "Florom 350". *Industrial Crops and Products*, 19(1): 13-17.
- Dewi, E.M.K., Soetjipto, H., Kristijanto, A.I. 2014. Karakterisasi dan Komposisi Kimia Minyak Biji Tumbuhan Kupu-Kupu (*Bauhinia purpurea* L.) Bunga Merah Muda. Di Dalam: Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains IX*; Salatiga, 21 Juni 2014. Salatiga. Halaman 11-17.
- Farnsworth, N. R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3): 243-269.
- Gandahusada, S., Illahude, H.H., dan Pribadi, W., (Eds.). 1998. *Parasitologi Kedokteran*, Edisi 3. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

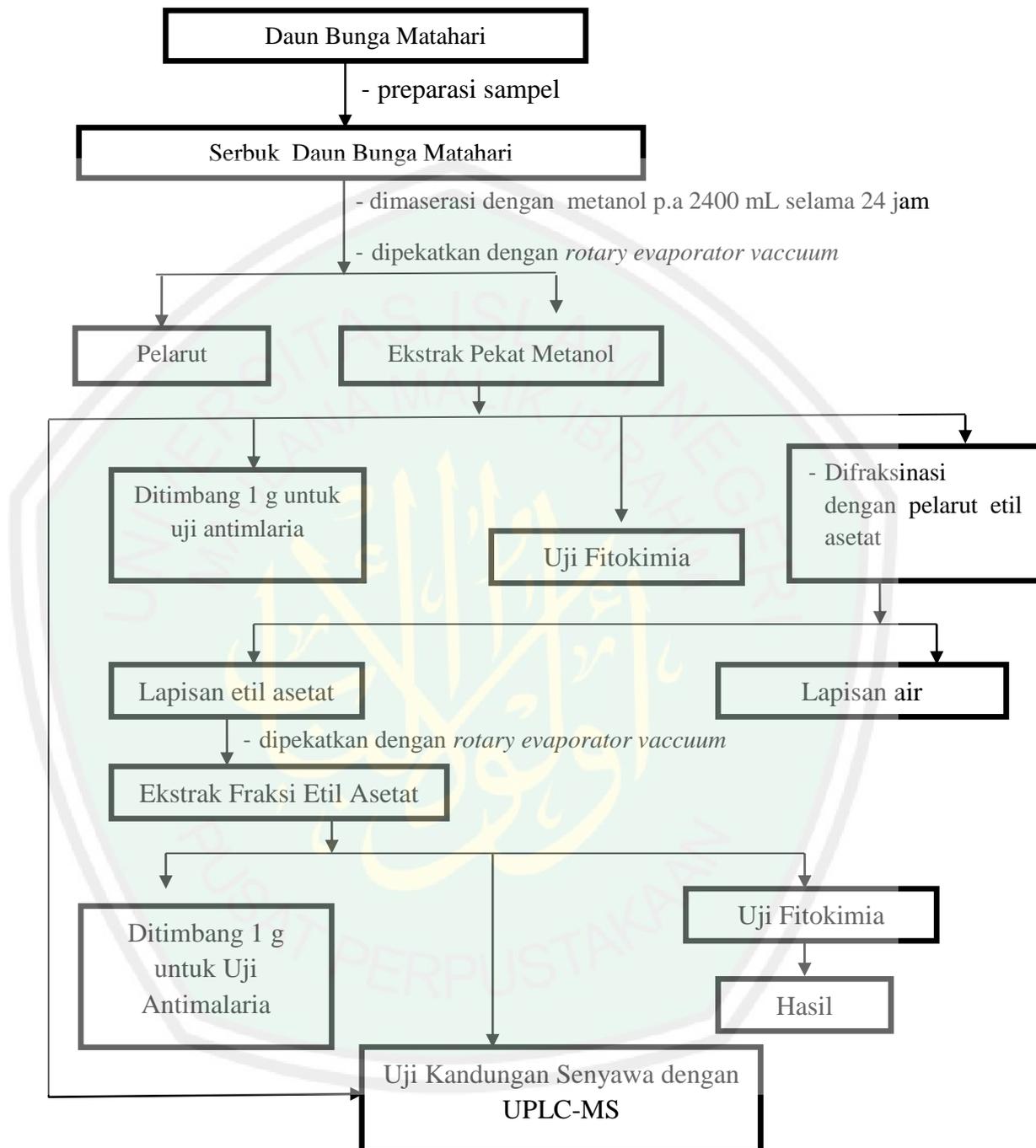
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. 2010. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gessler, M.C., Nkunya, M.H.N., Mwasumbi, L.B., Heinrich, M., dan Toner, M. 1994. Screening tanzanian medical plants for antimalarial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(1): 131-144.
- Guerra, C.A., Snow, R.W., dan Hay, S.I. 2006. Mapping The Global Extent of Malaria in 2005. *Trends in Parasitology*, 22(8): 353-358.
- Hafid, A.F., Sari, S., dan Widyawaruyanti, A. 2015. Efek Pemberian Dosis Berulang dan Dosis Tunggal Ekstrak Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus Champeden Spreng.*) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium Berghei*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13(1): 23-28.
- Handayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Haniah, Hayati, E.K., Muti'ah, R., dan Abtokhi, A. 2012. Identifikasi Ekstrak Metanol Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus L.*). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hariati, Y.P. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Fraksi Metanol dari Bunga Paitan (*Thithonia diversifolia*, Gray). *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Padmawinata K., dan Soediro I. Bandung: ITB.
- Harijanto, P.N., Nugroho, A., dan Gunawan, A.C. 2009. *MALARIA dari Molekuler ke Klinis Edisi 2*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Harth, H., Craine, L.E., dan Hart, D.J. 2003. *Organic Chemistry, a Short Course/Eleventh Edition*. Terjemahan Achmadi S.S. Jakarta: Erlangga.
- Hayati, E.K., dan Muti'ah, R. 2011. Potensi Senyawa Seskuiterpenoid Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus L.*) sebagai Antimalaria Pada Mencit Jantan dan Mencit Bunting Galur balb/C yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Laporan Penelitian Kompetitif Dosen*. Malang Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Ipteknet. 2011. *Tanaman Obat Indonesia. Bunga Matahari*. (Online), ([http://www.iptek.net.id/pd\\_tanobat/view.php?mnu=2&id=31](http://www.iptek.net.id/pd_tanobat/view.php?mnu=2&id=31)), diakses 12 Februari 2016.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Anaitik*. Terjemahan Saptorahardjo A. Jakarta: UI Press.

- Li, Q.W., Liu, F.B., Hou, Z.K., dan Luo, D. 2013. Treatment of Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome by Focusing on The Liver In Terms of Traditional Chinese Medicine: A Meta-Analysis. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 33(5): 562-571.
- Macias, F.A., Lopez, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Alves, A.A., dan Torres, A. 1998. Bioactive Norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with Potential Allelopathic Activity. *Phytochemistry*, 48(1): 631-636.
- Maggar, E.M.B.E. 2012. *Artemisia Herba Alba & Artemisia Monosperma*: The Discovery of The First Potential Egyptian Plant Sources for The Pharmaceutical Commercial Production of Artemisinin and Some of Its Related Analogues. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(7): 77-91.
- Manjoer, A. 2001. *Kapita Selekt Kedokteran Edisi Ketiga Jilid Pertama*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Maximus, M.T., Gunawan, Widyaruyanti, A., Nindatu, M., Zaini, N.C., Dahlan, Y.P., dan Sjafruddin. 2005. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Metanol, Fraksi dan Isolat-Isolat dari Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden Spreng*). *Farmasi Airlangga*, 3(2): 84-87.
- Muhtadi, dan Hartoyo. 2005. Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Tumbuhan Ayam (*Erythrina Variegata L.*) dan Puspa (*Schima Wallichii Korth*). *Penelitian Sains & Teknologi*, 6(1): 14 – 25.
- Muti'ah, R., Hayati, E.K., dan Triastutik, Y. 2013. Pemisahan dan Identifikasi Ekstrak Kasar Sesquiterpen Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus L.*) dengan Kromatografi Lapis Tipis. *Alchemy*, 2 (3): 190-194.
- Nengatik, 2011. *Manfaat Bunga Matahari (Helianthus annuus L.)*. (Online), (<http://manishapinengatik.blogspot.com//2011>), diakses 12 Februari 2016.
- Nieuwerburgh, F.C.W.V., Castele, S.R.F.V., Maes, L., Goossens, A., Inze, D., Bocxlaer, J.V., dan Deforce, D.L.D. 2006. Quantitation of Artemisinin and its Biosynthetic Precursors in *Artemisia annua L.* by high performance liquid chromatography-electrospray quadropole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1118(1):180-187.
- Nur, M., dan Adijuwana, H.A. 1989. *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor.
- Octavia, D.R. 2009. Uji Aktivitas Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Daun Binahong (*Anredera corfolia (Tenore) Steen*) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrasil). *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhamadiyah.

- Poedjiadi, A., dan Supriyanti, F. M. T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta : UI Press.
- Pramono, S. 2006. Penanganan Pascapanen dan Pengaruhnya terhadap Efek Terapi Obat Alami. Di Dalam: Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVIII*; Bogor, 12-18 September 2005. Bogor. Halaman 1-6.
- Priyanto. 2010. *Toksikologi, Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Risiko* Depok: Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi.
- Reddy, T., Kumar, S., Balammal, G., dan Kumar, A.S. 2012. Ultra Performance Liquid Chromatography: An Introduction and Review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Analysis*, 2(1): 24-31.
- Riguera, R. 1997. Isolating Bioactive Compound from Marine Organism. *Journal of Marine Biotechnology*, 5(2):187-193.
- Rinindar, Isa, M., dan Armansyah, T. 2013. Nilai Inhibition Concentration (IC<sub>50</sub>) Ekstrak Metanol Daun Sernai (*Wedelia biflora*) Terhadap *Plasmodium falciparum* yang Diinkubasi Selama 32 dan 72 Jam. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2): 8-12.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi. Terjemahan Padmawinata K. Bandung: ITB.
- Saxena, S., Pant, N., Jain, D.C., dan Bhakuni, R.S. 2003. Antimalarial Agents from Natural Sources in *Current Science*, 85(9): 1314-1329.
- Shihab, M. Q. 2000. *Tafsir Al-Misbah Volume 1*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Volume 7*. Jakarta: Lentera Hati.
- Simamora, D., dan Fitri, L.E. 2007. Resistensi Obat Malaria: Mekanisme dan Peran Obat Kombinasi Obat Antimalaria Untuk Mencegah. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23(2): 82-91.
- Simanjuntak, P. 1995. Tumbuhan sebagai Sumber Zat Aktif Antimalaria. Puslitbang Bioteknologi-LIPI. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 23(2): 1-11.
- Simpson, B.B., dan Ogarzaly, M.C.1986. *Economic Botany: Plants in Our World International Edition*. New York: Mc Grow Hill Company.
- Sirait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Penerbit ITB.

- Spring, O., Albert, K., dan Gradmann, W. 1982. Three Biologically Active Heliangolides From *Helianthus Annuus*. *Phytochemistry*, 21(10): 2551-2553.
- Su, X.Z. 1995. The Large Diverse Gene Family Encodes Proteins Involved In Cytoadherence and Antigenic Variation of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Cell*, 82(1): 89-100.
- Sudjadi. 1998. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Swartz, dan Michael, E. 2005. *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction*. Massachusetts : Waters Corporation.
- Taringan, J. 2007. *Kombinasi Kina Tetrasiklin pada Pengobatan Malaria: Falciparum Tanpa Komplikas di daerah Resisten Multidrug Malaria*. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Tjay, T.H., dan Rahardja, K. 2000. *Obat-obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. Jakarta: PT. Kimia Farma.
- Trager, W., dan Jensen, J.B. 1976. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Terjemahan Soewandi S.N. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada press.
- Trease, G., dan Evans, W.C. 2002. *Pharmacology, Edisi 15*. London. Saunders Publishers.
- Triastutik, Y. 2013. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kasar Sesquiterpen dari Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Terhadap Mencit Jantan (*Mus musculus*). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim.
- World Health Organization. 2006. *In Vitro* Micro-Test for The Assessment of The Response of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine, Mefloquine, Quinine, Amodiaquine, Sulfadoxine/Pyrimethamine and Artemisinin. *World Malaria Report*.
- Yang, N.Y., Duan., J.A., Shang, E.X., dan Tian, L.J. 2010. Analysis of Sesquiterpene Lactones in *Eupatorium lindleyanum* by HPLC-PDA-ESI-MS. *Phytochemical Analysis*, 21(1): 144-149.
- Zein, U., Fitri, L.E., Saragih, A. 2013. Comparative Study of Antimalarial Effect of Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Extract, Chloroquine and Artemisinin and Their Combination Against *Plasmodium falciparum* In-vitro, 45(1): 38-43.

## LAMPIRAN 1. Diagram Alir Penelitian



## Lampiran 2. Skema Kerja

### L.2.1 Preparasi Sampel

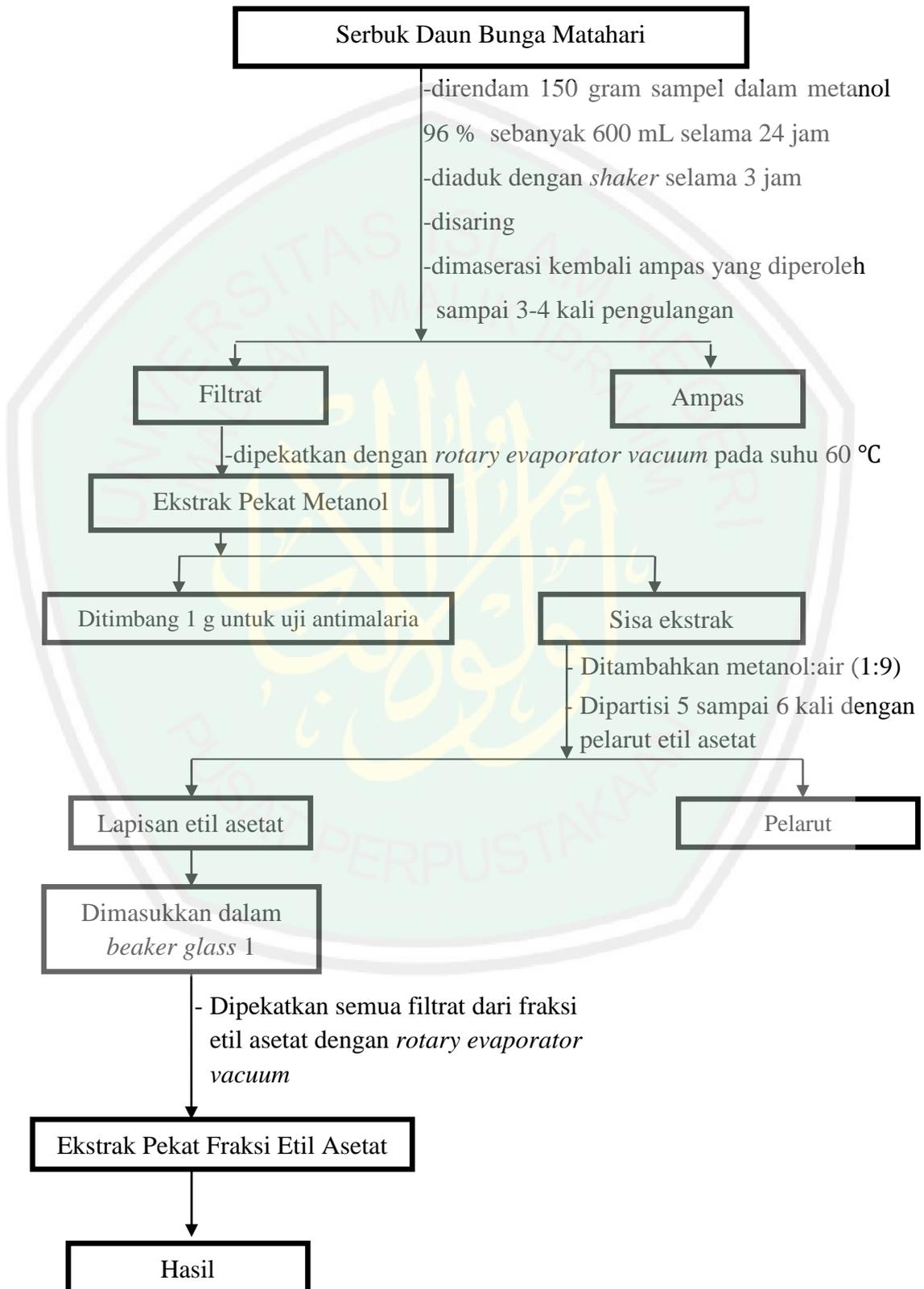
Daun Bunga Matahari

- diambil tanaman daun bunga matahari
- dicuci, dikering anginkan, dipotong kecil-kecil
- dikeringkan menggunakan oven pada suhu 30 - 37 °C
- dihaluskan dengan blender sampai serbuk dan diayak dengan ayakan 60

Hasil



### L.2.2 Ekstraksi Daun Bunga Matahari



- Sampel sebanyak 150 g diekstrak dalam dua tempat dan masing-masing jumlah sampel adalah 75 g dengan masing masing pelarut metanol 300 mL

### L.2.3 Uji Fitokimia

#### L.2.3.1 Uji Terpenoid

Ekstrak hasil maserasi dan partisi

- Diambil sedikit
- Ditambahkan 2 mL kloroform
- Ditambahkan 3 mL asam sulfat secara perlahan hingga terbentuk lapisan berwarna

Hasil

Warna merah kecoklatan menunjukkan positif terpenoid

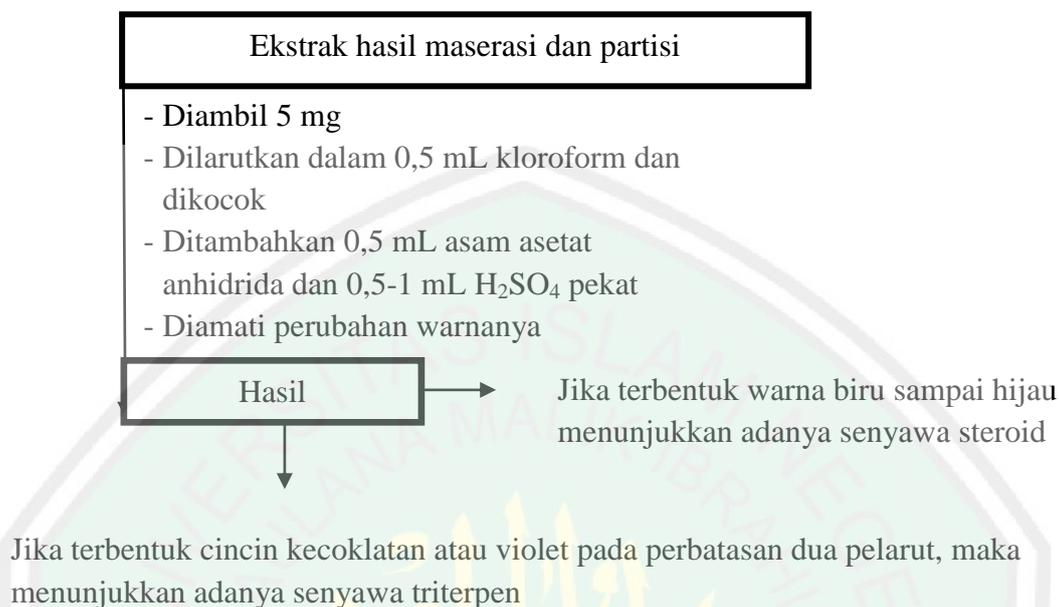
#### L.2.3.2 Uji Seskuitерpen

Ekstrak hasil maserasi dan partisi

- Diambil sedikit
- Dilarutkan dalam petroleum eter
- Diuapkan hingga kering
- Ditambah pereaksi vanilin 10 % dalam suasana asam sulfat
- Jika terbentuk warna-warna menunjukkan adanya seskuitерpen

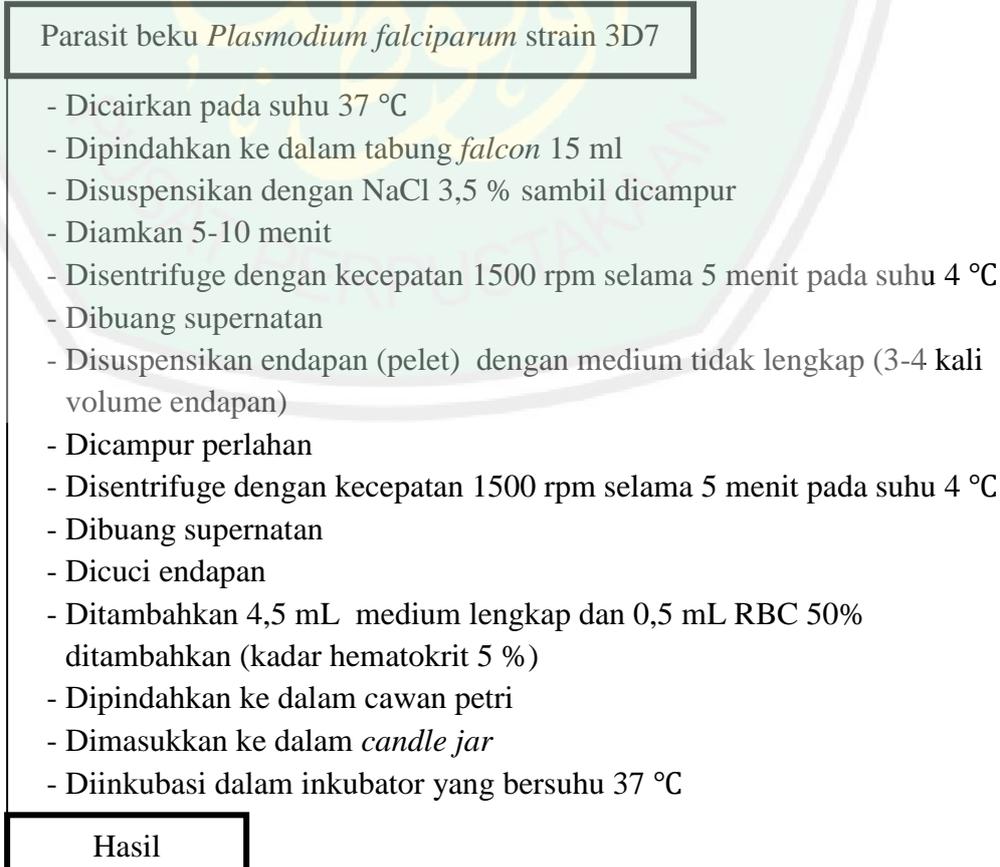
Hasil

### L.2.3.2 Uji Triterpen/Steroid



### L.2.4 Uji Antimalaria

#### L.2.4.1 Pencairan Parasit



#### L.2.4.2 Pemantauan Kultur

##### Medium kultur

- Diganti setiap hari
- Diambil media secara hati-hati dengan mikropipet dengan cara cawan petri yang berisi darah terinfeksi parasit diletakkan dengan posisi miring
- Ditambahkan medium baru sesuai dengan volume medium yang dibuang
- Dibuat hapusan darah tipis
- Dilakukan subkultur jika parasitemia lebih dari 4 %
- Diganti medium setiap hari dan dilakukan RBC 50 % jika masih rendah parasitemia yang diperoleh

##### Hasil

#### L.2.4.3 Sinkronisasi Parasit

##### Kultur parasit

- Dipindahkan ke *falcon* 15 mL yang terdapat di cawan petri
- Disentrifuge 1500 rpm selama 5 menit
- Dibuang supernatan
- Disuspensikan endapan dengan sorbitol 5 % sebanyak 3-4 kali volume endapan dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar
- Disentrifuge 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C
- Dibuang supernatan
- Dicuci endapan dengan medium tak lengkap (3-4 kali volume)
- Disentrifuge 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C
- Dicuci endapan dengan medium tak lengkap (3-4 kali volume)
- Disentrifuge 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C
- Dicuci Endapan
- Ditambahkan medium lengkap dengan RBC 50 %
- Dimasukkan ke dalam *candle jar*
- Diinkubasi dalam inkubator yang bersuhu 37 °C

##### Hasil

#### L.2.4.4 Persiapan Suspensi Parasit

Sel parasit

- Dibuat dari biakan *Plasmodium falciparum* yang telah disinkronisasi  $\pm 1$  % dan hematokrit 5 %.

Hasil

#### L.2.4.5 Persiapan Bahan Uji

Sampel ekstrak metanol dan fraksi etil asetat

- Dilarutkan 10 g dari masing-masing sampel dalam 100  $\mu$ L DMSO (larutan stok)
- Diencerkan dengan media lengkap
- Diperoleh konsentrasi 0,01 ; 0,1; 1; 10 ; dan 100  $\mu$ L/mL
- Dilakukan secara aseptik

Hasil

#### L.2.4.6 Uji Aktivitas Antimalaria

##### Suspensi parasit

- Dimasukkan 500  $\mu\text{L}$  dari stok dengan tingkat parasitemia  $\pm 1\%$  dan hematokrit 5 % dalam *plat well*
- ditambahkan dengan 500  $\mu\text{L}$  bahan uji dengan berbagai dosis sesuai dengan pola yang telah ditentukan pada *mikroplate* 1-5
- Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  suspensi parasit dan 500  $\mu\text{L}$  medium lengkap pada *well* 6
- Dimasukkan *plat well* dalam *candle jar*
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam
- Dibuang supernatan
- Dibuat hapusan darah tipis pada pelet
- Dikeringkan pada suhu kamar
- Difiksasi dengan metanol selama  $\pm 1-5$  detik
- Dikeringkan
- Diwarnai dengan giemsa 15 %
- Dibiarkan selama  $\pm 10$  menit
- Dicuci dengan air dan dikeringkan
- Diperiksa sediaan apusan tipis menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100 kali
- Dihitung % parasitemia
- Dihitung % pertumbuhan
- Dihitung % hambatan
- Dihitung % hambatan rata-rata
- Dihitung nilai *Inhibitory Concentration* ( $\text{IC}_{50}$ )

##### Hasil

#### L.2.5 Identifikasi Golongan Senyawa dengan UPLC-MS

##### Fraksi etil asetat

- Diambil 30 mg
- Dilarutkan dalam asetonitril
- Diukur larutan sampel dalam vial dengan kromatografi cair-spektroskopi massa melalui kolom C 18 1,7 $\mu\text{m}$  (2,1 mm  $\times$  50 mm) dengan kecepatan alir 0,3 mL/menit.

##### Hasil

## LAMPIRAN 3. Pembuatan Larutan

### L.3.1 Stok Sampel

Sampel yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 10 mg didalam *ependrof*, kemudian ditambahkan larutan DMSO sebanyak 100  $\mu\text{L}$ . Larutan stok diambil 10  $\mu\text{L}$  lalu ditambahkan dengan 490  $\mu\text{L}$  medium *complete*. Diperoleh larutan stok sebanyak 500  $\mu\text{L}$  dengan konsentrasi 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Variasi konsentrasi larutan dibuat untuk konsentrasi 100 ; 10; 1; 0,1; dan 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pembuatan larutan uji dilakukan secara aseptik dan dibuat duplo. Pembuatan larutan dengan konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan pengenceran.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$2000 \mu\text{g}/\text{mL} \times V1 \mu\text{l} = 100 \mu\text{g}/\text{mL} \times 1000 \mu\text{L}$$

$$V_1 \mu\text{L} = \frac{100 \mu\text{g}/\text{mL} \times 1000 \mu\text{g}/\text{mL}}{2000 \mu\text{g}/\text{mL}} = \frac{100000 \mu\text{L}}{2000 \mu\text{g}/\text{mL}} = 50 \mu\text{L}$$

### L.3.2 Preparasi Plasma

Plasma dicairkan didalam *inkubator*. Setelah mencair diinaktifkan dengan cara dipanaskan di *waterbath* selama 45 menit pada suhu 56 °C lalu dimasukkan ke dalam *falcon* dan disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

### L.3.3 Preparasi Darah RBC (*Red Blood Cell*) 50 %

Sebanyak 50 % darah ditambahkan 50 % media *complete* (perbandingan volume darah dan media *complete* yaitu 1:1).

### L.3.4 Pembuatan Media *Complete* (Hematokrit 50 %)

Media *rosewell parla memorial isntitute* (RPMI) sebanyak 45 mL dengan kandungan hematokrit 5 % ditambahkan dengan 5 mL plasma.

## LAMPIRAN 4. Perhitungan

### L.4.1 Nilai Rendemen

1. Ekstrak Peekat Metanol

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{16,78 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 8,39\% \end{aligned}$$

2. Fraksi Etil Asetat

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{3,53 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 35,3 \% \end{aligned}$$

### L.4.2 Uji Antimalaria

#### L.4.2.1 Sampel Ekstrak Kasar Metanol Daun Bunga Matahari

##### 1.1 Nilai % Parasitemia

1. D0 (% pertumbuhan pada jam ke-0) untuk kontrol (-), konsentrasi 100; 10; 1; 0,1; 0,01  $\mu\text{g/mL}$

$$\begin{aligned} \text{D0} &= \frac{\text{Eritrosit yang terinfeksi parasit}}{\text{Total eritrosit (1000 eritrosit)}} \times 100 \% \\ &= \frac{12,8}{1000} \times 100 \% \\ &= 1,28 \% \end{aligned}$$

2. Persen parasetimia pada jam ke- 48

$$\% \text{ parasetimia} = \frac{\text{Eritrosit yang terinfeksi parasit}}{\text{Total eritrosit (1000 eritrosit)}} \times 100 \%$$

➤ Kontrol (-)

$$1. \text{ \% parasetimia} = \frac{61,4}{1000} \times 100 \%$$

$$= 6,14 \%$$

$$2. \text{ \% parasetimia} = \frac{61,4}{1000} \times 100 \%$$

$$= 6,17 \%$$

➤ Konsentrasi 100 µg/mL

$$1. \text{ \% parasetimia} = \frac{23,4}{1000} \times 100 \%$$

$$= 2,34 \%$$

$$2. \text{ \% parasetimia} = \frac{23,4}{1000} \times 100 \%$$

$$= 2,35 \%$$

➤ Untuk perhitungan konsentrasi 10-0,01 µg/mL mengikuti perhitungan kontrol (-) atau konsentrasi 100 µg/mL

### 1.3 Nilai % Hambatan

$$\text{\% Hambatan} = 100\% - [Xu/Xk \times 100\%]$$

➤ Kontrol (-)

$$1. \text{ \% Hambatan} = 100 \% - [4,86/4,86 \times 100\%]$$

$$= 0$$

$$2. \text{ \% Hambatan} = 100 \% - [4,89/4,89 \times 100\%]$$

$$= 0$$

➤ Konsentrasi 100 µg/mL

$$1. \text{ \% Hambatan} = 100 \% - [1,06/4,86 \times 100\%]$$

$$= 78,19 \%$$

$$2. \text{ \% Hambatan} = 100 \% - [1,07/4,89 \times 100\%]$$

$$= 78,12 \%$$

- Untuk perhitungan konsentrasi 10-0,01  $\mu\text{g/mL}$  mengikuti perhitungan kontrol (-) atau konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$

#### 1.4 Nilai % Hambatan rata-rata

$$\% \text{ Hambatan rata-rata} = \frac{\% \text{ Hambatan 1} + \% \text{ Hambatan 2}}{2}$$

- Konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan rata-rata} &= \frac{78,19 \% + 78,12 \%}{2} \\ &= 78,15 \% \end{aligned}$$

- Untuk perhitungan konsentrasi 10-0,01  $\mu\text{g/mL}$  mengikuti perhitungan konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$

##### L.4.2.1 Sampel Fraksi Etil Asetat Daun Bunga Matahari

- Perhitungan nilai % parasetimia, % pertumbuhan, % hambatan dan % hambatan rata-rata mengikuti perhitungan ekstrak kasar metanol daun bunga matahari

## PERSEMBAHAN



## TERIMAKASIH

Teruntuk Allah SWT yang selalu tak henti-hentinya melimpahkan rahmat dan kenikmatannya kepadaku

Teruntuk Ibuku Tercinta yang selalu dan selalu memberikan SEMANGAT yang membara

Teruntuk Almarhum Ayah yang selalu mendoakanku dari kejauhan

Teruntuk Adek-adeknya mbak Ria yang tambah hari tambah membanggakan orangtua

Teruntuk "My Green" si Netbook yang sudah menemani 4,5 tahun ini

Tanpa kalian semua AKU bukanlah apa-apa hingga aku bias seperti ini

Bermandikan gelar seorang S.Si

Menjadi seorang yang lebih baik lagi

**"Jangan biarkan keterbatasan membuatmu tidak mampu berbuat lebih dari yang orang lain pikirkan..."**

**- Budi Waluyo -**