



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DIHIDROARTEMISININ DAN UJI AKTIVITAS
ANTIMALARIA SECARA *IN VITRO* DENGAN PROSES
HIDROGENASI MENGGUNAKAN KATALIS Ni/TiO₂**

TESIS

**TINA WIKARA
0706304826**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2010**

Universitas Indonesia

Sintesis dihidroartemisinin..., Tina Wikara, FMIPA UI, 2010.



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DIHIDROARTEMISININ DAN UJI AKTIVITAS
ANTIMALARIA SECARA *IN VITRO* DENGAN PROSES
HIDROGENASI MENGGUNAKAN KATALIS Ni/TiO₂**

TESIS

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk Memperoleh Gelar Magister Sains**

**TINA WIKARA
0706304826**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2010**

Universitas Indonesia

Sintesis dihidroartemisinin..., Tina Wikara, FMIPA UI, 2010.

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Tina Wikara

NPM : 0706304826

Tanda Tangan :

Tanggal : 16 Juli 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Tina Wikara
NPM : 0706304826
Program Studi : Ilmu Kefarmasian
Judul Tesis : Sintesis Dihidroartemisinin dan Uji Aktivitas Antimalaria Secara *In Vitro* Dengan Proses Hidrogenasi Menggunakan Katalis Ni/TiO₂

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Kefarmasian, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

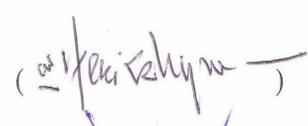
DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Harmita, Apt ()

Pembimbing : Prof. Dr. L. Broto. S. Kardono, Apt ()

Penguji : Dr. Arry Yanuar, MS ()

Penguji : Drs. Umar Mansyur, MSc ()

Penguji : Dr. Herry Cahyana ()

Penguji : Drs. Hayun, MSi ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 16 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

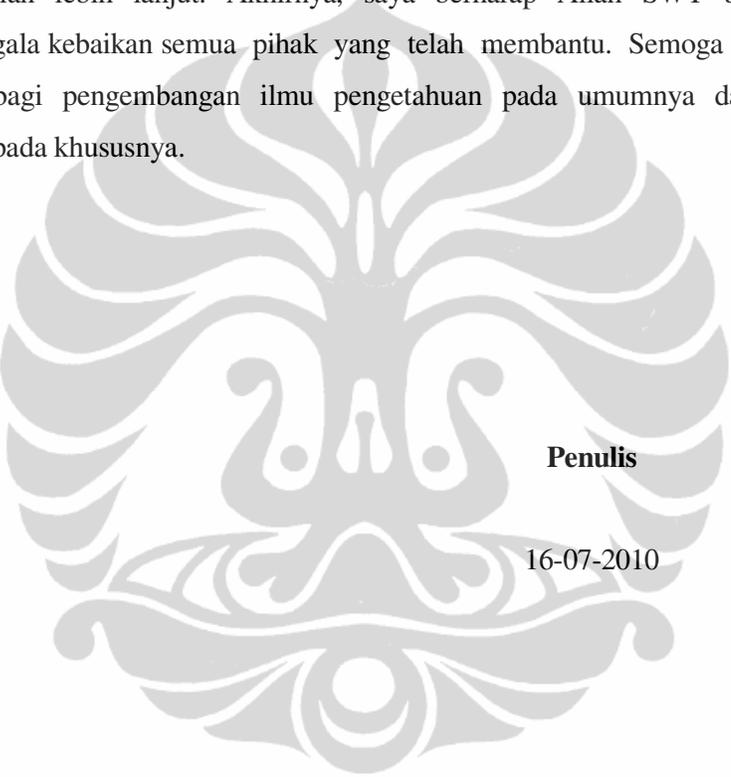
Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains pada program Ilmu Kefarnasian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya sangat menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Harmita, Apt selaku Pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
2. Prof. Dr. L. Broto. S. Kardono, Apt. selaku Pembimbing II dan Kepala Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong yang telah memberikan kesempatan dalam pelaksanaan penelitian serta arahan dalam penyusunan tesis ini.
3. Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Departemen Farmasi FMIPA UI
4. Prof. Dr. Effionora Anwar, MS selaku Ketua Program Pascasarjana Farmasi FMIPA UI
5. Dr. Silvester Tursiloadi, M.Eng selaku Kepala Bidang Katalis, Pusat Penelitian Kimia LIPI
6. Dr. M. Hanafi selaku Kepala Bidang Bahan Alam, Pangan dan Farmasi, Pusat Penelitian Kimia LIPI
7. Bapak dan Ibu dosen di Departemen Farmasi FMIPA UI
8. Bapak dan Ibu di Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong
9. Lia Nurliana, S.Si, Nur Hasanah, S.Far, Apt, Sri Teguh Rahayu, S.Far, Apt. (dan keluarga), dr. Sefni Gusmira, Rissyelly, S.Far, Apt dan rekan-rekan mahasiswa Program Pascasarjana Farmasi FIMPA UI
10. Pihak Eijkmen dan BATAN yang telah banyak membantu dalam usaha melengkapi data yang saya perlukan;

11. Sahabat-sahabat yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini;
12. Terakhir, terimakasih yang tak terhingga untuk Bapak Bono Winarto, Ibu Julaikha dan keluarga saya yang telah memberikan bantuan moral dan material, tanpa mereka tesis ini tidak akan pernah ada.

Saya menyadari penelitian dan penyusunan tesis ini masih banyak kekurangan dan perlu penelitian lebih lanjut. Akhirnya, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu kefarmasian pada khususnya.



Penulis

16-07-2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tina Wikara
NPM : 0706304826
Program Studi : Ilmu Kefarmasian
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
Sintesis Dihidroartemisinin dan Uji Aktivitas Antimalaria Secara In Vitro Dengan Proses Hidrogenasi Menggunakan Katalis Ni/TiO₂

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 16 Juli 2010
Yang menyatakan

(Tina Wikara)

ABSTRAK

Nama : Tina Wikara
Program Studi : Farmasi
Judul : Sintesis Dihidroartemisinin dan Uji Aktivitas Antimalaria Secara *In Vitro* Dengan Proses Hidrogenasi Menggunakan Katalis Ni/TiO₂

Artemisinin merupakan senyawa δ -seskuiterpen lakton dengan gugus unik peroksida yang berhasil diisolasi dari tanaman *Artemisia annua*. Dari hasil uji *in vitro* dan *in vivo*, artemisinin terbukti efektif melawan malaria dan menunjukkan hasil yang menggembirakan, bahkan untuk galur Plasmodium yang telah kebal sekalipun. Dihidroartemisinin adalah salah satu derivat artemisinin dari hasil semisintesis sederhana, yang lebih poten dari artemisinin.

Penelitian ini bertujuan memodifikasi struktur artemisinin menjadi dihidroartemisinin menggunakan katalis Ni/TiO₂ melalui proses hidrogenasi dan mengkaji aktivitasnya sebagai antimalaria melalui uji *in vitro*.

Cara baru modifikasi struktur artemisinin menjadi derivatnya dihidroartemisinin telah berhasil dilakukan melalui reaksi hidrogenasi menggunakan katalis Ni/TiO₂. Sintesis senyawa ini menghasilkan kristal berbentuk jarum dengan titik leleh 151-153°C. Rendemen yang diperoleh sebesar 16,58%. Analisa TLC dengan plat silika gel 60 F₂₅₄ menggunakan eluen toluene: etil asetat: asam formiat menunjukkan satu spot dengan R_f 0,44. Analisa LC-MS menunjukkan satu puncak dengan t_R 2,2 menit serta berat molekul 284,29 sama dengan dihidroartemisinin yaitu C₁₅H₂₄O₅. Spektrum IR menunjukkan adanya gugus hidroksil pada frekuensi 3371,57 cm⁻¹ didukung dengan munculnya pita serapan dari vibrasi ulur C-O pada frekuensi 1034,14 cm⁻¹. Reaksi hidrogenasi tidak merusak keberadaan gugus endoperoksida. Hal ini terbukti dengan masih terdapatnya serapan vibrasi ulur dari C-O-O-C pada frekuensi 1091,71; 875,68; 844,82 cm⁻¹. Dari data NMR membuktikan bahwa senyawa tersebut adalah campuran rasemat α/β dihidroartemisinin. Senyawa ini mempunyai aktivitas antimalaria dengan IC₅₀ 0,20 nM, melalui uji *in vitro* menggunakan biakan *Plasmodium falciparum* kultur 3D7.

Kata Kunci : Artemisinin, Dihidroartemisinin, Sintesis, Hidrogenasi, Antimalaria
xv+68 halaman : 14 gambar; 6 tabel
Daftar Pustaka : 42 (1982-2009)

ABSTRACT

Name : Tina Wikara
Program Study : Pharmacy
Title : Synthesis and *In Vitro* Antimalarial Activity of Dihydroartemisinin With Hydrogenation Process Using Ni/TiO₂ Catalyst

Artemisinin is a δ -sesquiterpene lactone that incorporates an endoperoxide moiety. This compound is isolated as the active compound of *Artemisia annua*. Based on the result of *in vitro* and *in vivo* assay, artemisinin is an effective antimalarial drug and it shows positive result, moreover strain of *Plasmodium* resistant. Dihydroartemisinin is the simplest semisynthetic derivative of artemisinin and is more potent than artemisinin.

The objective of this research are to modify the structure of artemisinin into dihydroartemisinin. A new way to modify the structure of artemisinin into dihydroartemisinin, had been successfully done using hydrogenation process with Ni/TiO₂ catalyst, and the result was a soft white needle like crystal with melting point of 151-153°C. The yield of the crystal was 16.58%. the TLC analysis on TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ using toluene: etil asetat: asam formiat showed a spot with R_f 0.44. LC-MS analysis showed that the compound contained mainly a peak with t_R 2.2 minutes and mass spectrum showed that the molecular weight of the compound was 284.29 which is similar to that of dihydroartemisinin, C₁₅H₂₄O₅. The IR spectrum showed that there was a spectrum from C-O in a frequency of 1034.14 cm⁻¹. Hydrogenation reaction did not destroy the existence of endoperoxide group. This was proven by the existence of C-O-O-C in a frequency of 1091.71; 875.68; 844.82 cm⁻¹. NMR data showed that the compound was the mixture of racemic. The compound also had the activity of antimalarial with IC₅₀ 0.20 ng/ml by using *in vitro* test with *Plasmodium falciparum* strain 3D7.

Key Words : Artemisinin, Dihydroartemisinin, Synthesis, Hydrogenation, Antimalaria
xv+68 pages : 14 pictures; 6 tables
Bibliography : 42 (1982-2009)

BAB 1

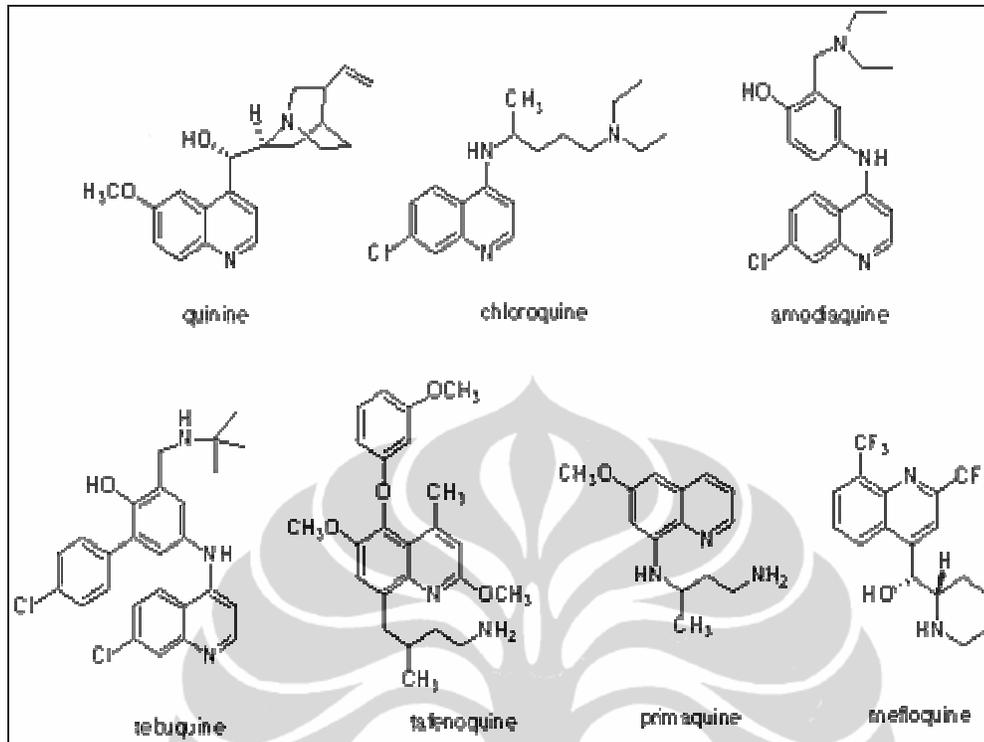
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit malaria merupakan penyakit dengan tingkat kematian tertinggi dari seluruh penyakit parasitik dan penyebab kematian ketiga oleh infeksi setelah *tuberculosis* dan AIDS (Frederic et al., 2008). Menurut WHO, saat ini sekitar dua milyar manusia terkena resiko ancaman penyakit malaria dan penyakit ini telah menyebabkan korban sampai 1- 3 juta korban meninggal. Indonesia merupakan daerah endemis malaria, walaupun telah dilakukan program pelaksanaan dan pemberantasan penyakit malaria sejak tahun 1959, namun hingga saat ini angka kesakitan dan kematian masih cukup tinggi (Simanjuntak dan Arbani, 2009).

Faktor penyebab belum berhasilnya program pemberantasan malaria diantaranya adalah karena rantai penularan dan daur hidup parasit malaria yang sangat kompleks, adanya penurunan efektivitas penyemprotan DDT, vektor telah resisten insektisida dan semakin meluasnya populasi parasit yang kebal terhadap obat antimalaria (Purwantiningsih, 2003).

Dengan banyaknya kasus malaria yang terjadi maka kebutuhan obat antimalaria semakin meningkat dan beberapa obat antimalaria (gambar 1) yang telah dikenal seperti quinolinametanol dan 4-aminoquinolin antagonis folat, 8-aminoquinolin dan turunan artemisinin. Quinin dikenal sebagai obat antimalaria sampai tahun 1930-an, kemudian dikembangkan obat semisintetik quinolin seperti klorokuin, meflokuin dan amodiaquin. Resistensi parasit malaria terhadap klorokuin muncul pertama kali di Thailand pada tahun 1961 dan di Amerika Serikat pada tahun 1962. dari kedua fokus ini resistensi meluas keseluruh dunia. Di Indonesia resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin ditemukan pertama kali didaerah kalimantan timur pada tahun 1974, kemudian resistensi ini terus meluas dan pada tahun 1996 kasus-kasus malaria yang resisten klorokuin, sulfadoksin-primetamin, kina, amodiakuin, meflokuin dan halofantrin sudah ditemukan di seluruh provinsi di Indonesia (Harijanto, 2009; DEPKES, 1995).



Gambar 1 Obat antimalaria (Ramachandran, 2002)

Inti dari suatu penelitian senyawa obat adalah pengembangan zat aktif baru untuk menyembuhkan penyakit dengan terapi obat sampai saat ini tidak atau belum berjalan seperti yang diharapkan, atau untuk mengurangi resiko terapeutik jika dibandingkan dengan obat lama (Wattimena, et al., 1991). Hal ini yang mendorong para peneliti dalam penemuan obat baru yang dalam waktu relatif singkat melakukan modifikasi struktur molekul yang lebih sederhana dengan cara sintesis, dalam usaha mendapatkan senyawa analog atau senyawa baru dengan aktivitas lebih tinggi.

Berdasarkan pertemuan komisi ahli malaria (KOMLI) strategi pengobatan malaria secara nasional telah direkomendasikan untuk diubah. Hal ini karena sudah terjadi multiresistensi terhadap obat standar di lebih dari 25 % provinsi di Indonesia. Perubahan mendasar ini sesuai dengan rekomendasi global WHO untuk menggunakan obat golongan artemisinin yang dikombinasikan atau turunannya (Harijanto, 2009).

Artemisinin awalnya dikembangkan di Cina tahun 1972 oleh *Chinese Institute of Material Medicine* dari tanaman *Artemisia Annuua L. (sweet wormwood)*. Pada tahun 1979 struktur artemisinin telah berhasil dielusidasi dengan rumus empiris $C_{15}H_{22}O_5$ dan secara sistematis namanya adalah [3R-(3 α ,5 α ,6 β ,8 α ,9 α ,12 β ,12aR*)]-oktahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoksi-12H-pirano[4,3-j]-1,2-bensodioxepin-10-(3H)-on (The Merck Index, 2001).

Artemisinin dan turunannya seperti dihidroartemisinin, artemeter, artesunat dan arteeter dapat mencegah penghambatan gametosit dan belum terlihat adanya resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap obat antimalaria ini. Di Cina pada tahun 1979 lebih kurang 2.099 pasien yang terinfeksi *P. vivax* dan *P. falciparum* telah dicoba diterapi menggunakan artemisinin dan ternyata hasilnya sangat bagus dan tanpa efek samping. WHO telah merekomendasikan penggunaan kombinasi obat anti malaria untuk mengatasi malaria resisten klorokuin, khususnya malaria *falciparum*. Artemisinin adalah salah satu komponen utama dalam kombinasi tersebut, efektif untuk malaria cerebral atau malaria tropika, dan telah terbukti bahwa suhu tubuh pasien dapat dinormalkan dalam waktu 72 jam sedangkan parasit aseksual bisa dihilangkan dalam waktu 72 jam. Bahkan di Vietnam, artemisinin telah dicoba diberikan kepada anak-anak usia 1 sampai 15 tahun yang dipilih secara selektif dengan tujuan agar tidak terinfeksi parasit *P. Falciparium* dan ternyata terbukti berhasil dengan baik (Harijanto, 2009).

Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa artemisinin mempunyai kemampuan untuk memutus rantai siklus hidup parasit dalam sel darah merah, dan belum ada laporan kasus malaria tahan artemisinin. Tetapi aplikasi klinik artemisinin sebagai *therapeutic agent* dibatasi oleh beberapa faktor. Artemisinin mempunyai kecepatan kambuh dalam 8 minggu (*rate of recrudescence*) yang tinggi, aktivitas oralnya rendah pada dosis yang dikehendaki, waktu paruh di plasma rendah dan kelarutannya terbatas baik dalam air maupun dalam minyak (Lin, et al., 1995). Selain itu, artemisinin juga dapat terurai dalam pelarut yang mengandung proton (*protic solvent*). Oleh karena itu, usaha untuk mengatasi masalah *therapeutic* dan farmasi ini, antara lain melalui modifikasi struktur kimia artemisinin menjadi senyawa analognya dan diharapkan akan

memberikan kelebihan dan beberapa keuntungan dibandingkan senyawa induknya. Salah satu turunan artemisinin yang larut air adalah dihidroartemisinin, sedangkan yang larut minyak adalah kelompok eter yaitu artemeter dan arteeter (Klayman, 1985).

Senyawa artemisinin dan turunannya menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Dihidroartemisinin merupakan turunan artemisinin yang larut dalam air. Modifikasi artemisinin menjadi dihidroartemisinin dilakukan melalui reaksi reduksi. Nilai IC_{50} dihidroartemisinin pada galur *P. falciparum* resisten-klorokuin dan sensitif meflokuin adalah 0,51 nM sedangkan pada galur *P. falciparum* sensitif-klorokuin dan resisten-meflokuin adalah 0,52 nM. Nilai IC_{50} dihidroartemisinin 5 kali lebih tinggi dari pada aktivitas artemisinin (Lin, et al., 1995).

Pada artemisinin terikat gugus karbonil (C=O) sedangkan pada dihidroartemisinin terikat gugus hidroksi (C-OH). Konversi gugus karbonil menjadi hidroksi dikenal sebagai reaksi reduksi. Reaksi reduksi dapat berlangsung dengan bantuan suatu reduktor. Reduktor yang paling sering digunakan adalah $LiAlH_4$ dan $NaBH_4$. Beberapa penelitian sebelumnya tentang sintesis dihidroartemisinin menggunakan katalis $NaBH_4$ pada proses reduksinya dilaporkan bahwa reduktor $NaBH_4$ mereduksi gugus karbonil laktone tanpa memutuskan ikatan peroksida (Geldre et al., 1997; El-Ferally et al., 1990; Vishwakarma, 1990).

Berbeda dengan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, pada penelitian ini dihidroartemisinin akan disintesis melalui reduksi menggunakan katalis padat sehingga diharapkan akan memperoleh turunan artemisinin dengan rendemen yang lebih besar, lebih murni dan lebih mudah dalam proses pemisahan. Untuk mendapatkan senyawa dengan kemurnian tinggi diperlukan suatu jenis katalis yang mempunyai sifat-sifat fisik yang bagus, yaitu katalis mesopori berorde nano yang berkemampuan hidrogenasi yang mengandung logam aktif. Merujuk kepada penelitian yang dilakukan sebelumnya, bahwa penggunaan katalis padat Ni/TiO_2 telah berhasil untuk mensintesis isopulegol menjadi mentol melalui reaksi hidrogenasi maka pada penelitian ini digunakan katalis tersebut (Jenie, 2009). Penelitian ini menggunakan tahapan yaitu preparasi katalis padat

TiO₂ yang diimpregnasikan dengan Ni dengan metode sol gel. Penyangga dapat mempengaruhi adsorpsi dan aktivitas/selektivitas hidrogenasi gugus karbonil dari nikel.

Reaksi hidrogenasi dihidroartemisinin menjadi artemisinin berlangsung menggunakan katalis logam berbasis nikel yang memiliki sifat reduksi. Disamping itu, logam-logam seperti Rh, Ru, Pt dan Pd juga dilaporkan mempunyai aktivitas yang tinggi tetapi secara ekonomis kurang menguntungkan karena harganya yang sangat mahal. Proses yang terjadi adalah terikatnya gugus karbonil dalam struktur artemisinin kepada permukaan logam sehingga kestabilannya terganggu. Selanjutnya hidrogen akan masuk kedalam struktur dan terbentuk dihidroartemisinin (Usman, 2001).

Hasil sintesis yang diperoleh dimurnikan menggunakan kolom kromatografi silika gel, kemudian diidentifikasi dengan spektrometer infra merah, spektrometer massa dan spektrometer NMR dan selain itu didukung dengan data kromatografi lapis tipis dan titik leleh. Untuk mengetahui aktivitasnya, maka senyawa tersebut diuji kemampuannya dengan menghambat pertumbuhan parasit secara *in vitro*.

Penelitian ini dibagi menjadi dua bagian yang saling berhubungan. Bagian pertama, preparasi katalis dan sintesis senyawa derivatif artemisinin yang bertujuan menghidrogenasi artemisinin dengan menggunakan katalis Ni/TiO₂ dalam pelarut metanol yang dipanaskan pada suhu 100°C selama ± 5 jam untuk menghasilkan senyawa dihidroartemisinin. Penelitian bagian kedua bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria senyawa hasil sintesis dalam biakan parasit *P. falciparum* yang telah digunakan untuk mengidentifikasi beberapa zat antimalaria. Penelitian ini akan membuktikan bahwa sintesis kimia dengan proses hidrogenasi menggunakan katalis padat dapat menghasilkan senyawa obat turunan artemisinin yang lebih baik aktivitas antimalariannya.

1.2 Rumusan Masalah

Dari penelusuran pustaka diketahui bahwa sintesis artemisinin menjadi derivatnya pada umumnya menggunakan reduktor NaBH_4 maupun LiAlH_4 yang merupakan katalis cair yang proses pemisahannya adalah cair-cair. Penggunaan katalis padat Pd/C sebagai reduktor pada proses sintesis artemisinin menjadi derivatnya juga telah diteliti tetapi masih menunjukkan beberapa kelemahan seperti waktu reaksi yang sangat lama (20 jam), pecahnya jembatan peroksida sehingga dapat menghilangkan aktivitas antimalarianya. Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan katalis padat Ni/TiO₂ yang diharapkan dapat mensintesis artemisinin menjadi derivatnya tanpa merusak gugus peroksida sehingga masih memiliki aktivitas antimalaria dan lebih mudah dalam proses pemisahan.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Memodifikasi struktur artemisinin menjadi dihidroartemisinin yang mempunyai aktivitas lebih tinggi dengan menggunakan katalis padat dengan proses hidrogenasi.
2. Mengetahui aktivitas antimalaria senyawa yang dihasilkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Proses Terjadinya Malaria

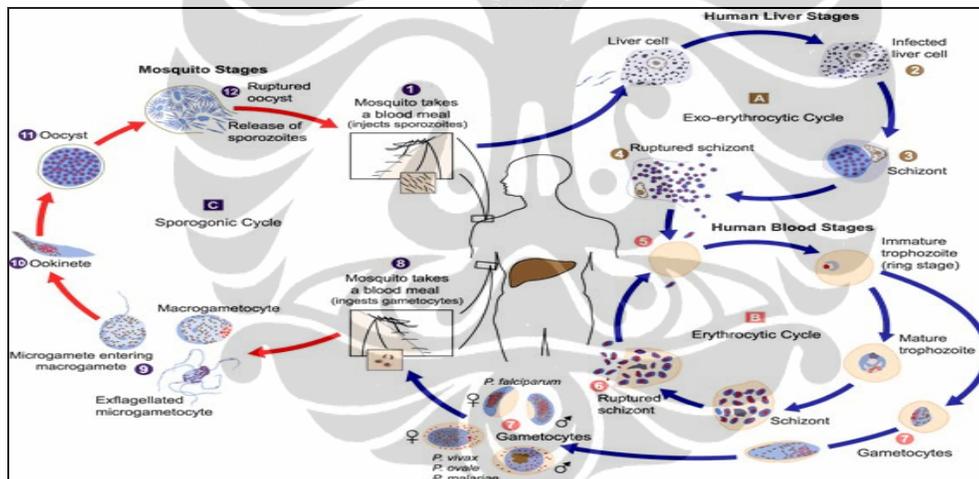
Malaria adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh infeksi protozoa dari *genus Plasmodium* dan mudah dikenali dari gejala demam (panas dingin menggigil) yang berkepanjangan. Penularan penyakit malaria biasanya melalui gigitan nyamuk anopheles betina. Dalam siklus hidupnya plasmodium mempunyai dua hospes yaitu manusia dan nyamuk. Siklus aseksual yang berlangsung pada manusia disebut skizogoni dan siklus seksual yang membentuk sporozoit didalam nyamuk seperti sporogoni (Nugroho dan Wagey, 2000).

a. Siklus aseksual

Sporozoit infeksius dari kelenjar ludah nyamuk anopheles betina masuk dalam darah manusia melalui gigitan nyamuk tersebut. Dalam waktu tiga puluh menit jasad tersebut memasuki sel-sel parenkim hati dan dimulainya stadium eksoeritrositik daur hidupnya. Di dalam sel hati, parasit tumbuh menjadi skizon dan berkembang menjadi merozoit. Sel hati yang mengandung parasit pecah dan merozoit keluar dengan bebas, sebagian mengalami fagositosis. Oleh karena prosesnya terjadi sebelum memasuki eritrosit maka disebut stadium pre-eritrositik atau ekso-eritrositik. Siklus eritrositik dimulai saat merozoit menerobos masuk sel darah merah. Parasit tampak sebagai kromatin kecil, dikelilingi oleh sitoplasma yang membesar, bentuk tidak teratur dan mulai membentuk tropozoit. Tropozoit berubah menjadi skizon muda, kemudian berkembang menjadi skizon matang dan membelah diri menjadi merozoit. Dengan selesainya pembelahan tersebut sel darah merah pecah dan merozoit, pigmen dan sisa sel keluar dan bebas berada dalam plasma darah. Merozoit dapat masuk sel darah merah lainnya lagi untuk mengulangi siklus skizogoni. Selain dapat memasuki eritrosit kembali dan membentuk skizon, merozoit dapat membentuk gametosit yaitu bentuk seksual parasit plasmodium (Nugroho dan Wagey, 2000).

b. Siklus seksual

Siklus seksual terjadi dalam tubuh nyamuk. Gametosit yang ada di darah tidak dicerna oleh sel-sel tubuh lain. Pada gamet jantan, kromatin membagi menjadi 6-8 inti yang bergerak ke pinggir parasit. Di pinggir ini beberapa filamen dibentuk seperti cambuk dan bergerak aktif disebut mikrogamet. Pembuahan terjadi karena masuknya mikrogamet ke dalam makrogamet untuk membentuk zigot. Zigot berubah bentuk menjadi seperti cacing pendek disebut ookinet yang dapat menembus lapisan epitel dan membran basal dinding lambung nyamuk. Di tempat ini ookinet membesar dan disebut ookista. Didalam ookista dibentuk ribuan sporozoit dan beberapa sporozoit menembus kelenjar ludah nyamuk dan bila nyamuk menggigit manusia memungkinkan sporozoit masuk kedalam darah dan mulailah siklus pre eritrositik (Nugroho dan Wagey, 2000).



Gambar 2.1 Siklus hidup *Plasmodium*

Malaria dapat juga ditularkan secara langsung melalui transfusi darah, jarum suntik serta dari ibu hamil kepada bayinya. Penyebab mortalitas penyakit malaria adalah infeksi *Plasmodium falciparum* yang dapat menyebabkan malaria berat baik pada orang dewasa maupun pada anak-anak. Kejadian malaria berat masih merupakan ancaman karena mortalitasnya masih bervariasi dari 10-50% tergantung dari kemampuan diagnosis dan pelayanan kesehatan untuk pengobatan yang adekuat. Masalah lain ialah keterlambatan diagnosis dan penanganan baik

dari pasien maupun tenaga medik serta resistensi terhadap obat-obat malaria (Harijanto, 2009).

2.1.2 Obat-obat Antimalaria

Dilihat dari struktur molekul dan aktivitasnya, obat antimalaria dapat dibagi dalam beberapa kelompok, antara lain (Ramachandran, 2002):

a. 8-aminokuinolin

Diantara turunan senyawa ini adalah: Primakuin digunakan secara luas pada pengobatan dari hipnozoit (reservoar hati) disebabkan *P. vivax* dan *P. ovale*, tetapi primakuin baru-baru ini digunakan juga untuk pencegah (profilaksis) malaria, mengeliminasi *P. falciparum* penyebab infeksi. Ketika parasit aktif didalam hati, perlu dilakukan pencegahan penyakit secara klinik. Gejala serius dari penyakit ini dapat menyebabkan pasien kekurangan glukosa 6-fosfat dihidrogenase.

b. 4-aminokuinolin

Merupakan senyawa antimalaria yang sangat kuat untuk pengobatan dan pencegahan malaria. 4-aminokuinolin pada konsentrasi tinggi dapat terakumulasi pada bagian makanan bersifat asam dalam vakuola dari *Plasmodium* dan membunuh parasit tersebut. Klorokuin dan amodiakuin yang termasuk dalam golongan senyawa ini.

c. Kuinolin-metanol

Kuinolin-metanol adalah senyawa bentuk lain dari 4-aminokuinolin. Bentuk tersebut dapat menyebabkan lebih aktif dibandingkan dengan 4-aminokuinolin pada taraf intra-eritrosit. Kuinin adalah bentuk kuinolin metanol, memiliki daya toksik yang sangat efektif terhadap *P. falciparum*, berinteraksi secara lemah pada heme, tetapi diketahui menghambat pembentukan polimer heme secara *in vitro*. Meflokuin adalah kuinolin-metanol dengan struktur dan sifat hampir sama dengan kuinin. Antimalaria dari senyawa kuinolin-metanol dapat menyebabkan resistensi *Plasmodium*.

d. Aril-alkohol

Bentuk senyawa ini antara lain: Halofantrin, meskipun efektif sebagai obat antimalaria tetapi menyebabkan resisten, karena itu penggunaannya terbatas, hanya sebagai terapeutik dan dibuat sebagai formulasi parental. Pironaridin adalah obat sintesis turunan acridin, menyebabkan multiresisten pada malaria *falciparum*, karena itu obat ini hanya digunakan sebagai monoterapi. Dilaporkan bahwa halofantrin, meflokuin dan kuinin mempunyai korelasi resistensi dengan klorokuin dan amodiakuin. Pada resistensi yang tinggi klorokuin menyebabkan parasit lebih sensitif terhadap aril-alkohol.

e. Folat antagonis

Folat antagonis adalah bentuk senyawa sintesis berperan sebagai inhibitor pirimidin parasit dan DNA parasit. Bentuk senyawa antifolat yaitu: (i) inhibitor dihidroksi antifolat reduktase (DHFR), berupa primetamin dan kloroproguanil. (ii) inhibitor dihidropteroat sintase (DHFS) yaitu sulfon dan sulfonamida dikenal dengan sulfadoksin dan dapson. Penggunaan obat ini biasanya dalam bentuk kombinasi antara kelompok satu dan dua atau kombinasi dengan obat antimalaria lainnya. Salah satu kombinasi obat tersebut adalah antara proguanil dan atovakuinon (malaron). Malaron banyak digunakan dalam pengobatan malaria. Mekanisme sinergis proguanil dengan atovakuinon adalah kompleks. Kombinasi obat tersebut lebih toleran dan efektif dibandingkan dengan klorokuin, primetamin, sulfadoksin, meflokuin tetapi multi obat ini dapat menyebabkan resistensi pada *P. falciparum*.

f. Artemisinin dan turunannya

Artemisinin dan turunannya merupakan antimalaria yang sangat aktif. Tiga turunan artemisinin yang dikenal sama aktivitasnya, yang larut dalam air-hemisuksinat, yaitu artesunat; dua lainnya larut dalam minyak yaitu artemeter dan arteeter. Artemisinin dan turunannya ini sangat baik sebagai alternatif obat antimalaria. Artemeter digunakan oleh WHO sebagai obat esensial untuk pengobatan yang sangat baik terhadap malaria multi resistensi.

2.1.3 Resistensi Terhadap Obat Antimalaria

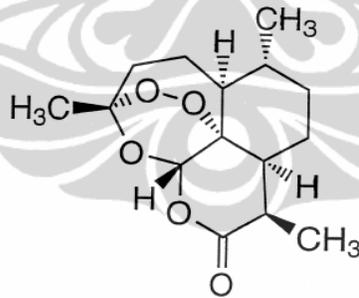
Resistensi terhadap obat antimalaria didefinisikan sebagai kemampuan suatu galur parasit untuk bertahan hidup dan/atau berkembang biak pada pemberian dan absorpsi obat dengan dosis setara atau lebih tinggi dari dosis yang direkomendasikan, tetapi masih dalam batas toleransi dari pasien (Trager dan Jensen, 1976).

Karakterisasi parasit yang resisten diawali dengan kasus gagal obat yang jelas, dimana diagnosis klinis, parasitemia dan kadar darah metabolit obat tersebut telah diketahui. Analisis *in vitro* pada isolat malaria yang diperoleh dari kasus tersebut harus dilakukan untuk mendapatkan nilai IC_{50} dari obat tersebut sehingga diketahui status yang jelas dari resistensi tersebut (WHO, 2005).

Parasit resisten terhadap obat ditandai dengan menetapnya/ timbulnya kembali parasit aseksual dalam perifer (rekrudensi) yang dapat atau tanpa disertai gejala klinis malaria.

2.2 Artemisinin

2.2.1 Monografi (The Merck Index, 2001)



Gambar 2.2 Struktur artemisinin (Geldre et al, 1997)

Rumus molekul	: $C_{15}H_{22}O_5$
Berat molekul	: 282.332 g/mol
Pemerian	: Kristal ortorombik tak berwarna berbentuk jarum
Kelarutan	: Sangat larut dalam pelarut nonpolar bertitik didih rendah seperti kloroform, eter, dietil eter, aseton dan etil asetat dan sedikit

larut dalam air dan minyak dan dapat terurai dalam pelarut yang mengandung proton dengan terbukanya cincin lakton.

2.2.2 Farmokologi

Artemisinin atau “Qinghaosu” merupakan obat antimalaria kelompok seskuiterpen lakton. Obat artemisinin ini merupakan obat *partner* pilihan untuk kombinasi obat karena kelebihanannya yaitu diabsorpsi baik, aman, cepat diubah menjadi bentuk metabolit yang aktif, mempunyai waktu paruh yang sangat pendek (2 jam), aktivitasnya luas dan sangat kuat. Kelemahan dari kelompok artemisinin ini adalah memerlukan waktu pengobatan lama apabila pengobatan hanya menggunakan obat artemisinin saja (*monotherapy*) (Lin, et al., 1995).

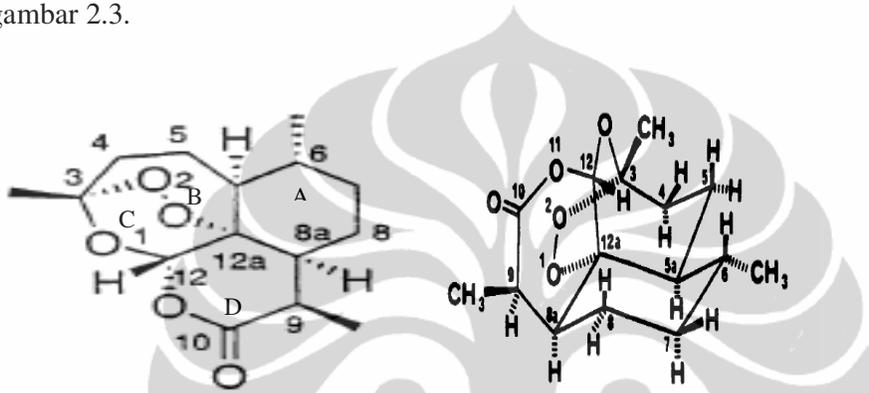
Kombinasi artemisinin dengan obat-obat antimalaria yang tersedia di Indonesia yaitu antara lain dengan klorokuin, sudah tidak rasional lagi karena klorokuin secara umum sudah tidak efektif lagi. Walaupun di beberapa daerah sulfadoksin/primetamin masih cukup efektif dan uji klinik kombinasi artemisinin dengan sulfadoksin/pirimetamin untuk pengobatan malaria falsiparum di Papua menunjukkan resiko kegagalan pengobatan dengan kombinasi jauh lebih kecil (RR=0,3) dibandingkan dengan hanya sulfadoksin/pirimetamin, tetapi kombinasi ini bukan merupakan kombinasi yang terbaik (Purwantiningsih, 2003).

2.2.3 Struktur, Sifat Fisik dan Kimia Artemisinin

Struktur artemisinin termasuk kelompok seskuiterpen lakton (δ -valerolakton) dan dari data analisis spektrofotometri massa resolusi tinggi, disimpulkan senyawa tersebut mempunyai BM 282,34 dengan distribusi 63,81 % C; 7,85% H dan 28,33% O. Dari data inipun dapat disimpulkan bahwa artemisinin mempunyai rumus empiris $C_{15}H_{22}O_5$. Nama IUPAC artemisinin adalah [3R-(3 α ,5 α ,6 β ,8 α ,9 α ,12 β ,12aR*)]-oktahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoksi-12H-pirano [4,3-j]-1,2-bensodioxepin-10-(3H)-on, sedangkan nama lain artemisinin adalah artemisin, arteannuin, huang hua haosu, qinghaosu, QHS dan qing hau sau (The Merck Index, 2001).

Data kristalografi sinar X menunjukkan bahwa 15 atom karbon dan 5 atom oksigen sebagai unsur penyusun dalam struktur artemisinin tersusun dari 4 cincin:

A, B, C dan D. Cincin A merupakan sikloheksana dengan konformasi kursi, cincin D merupakan δ -lakton yang berperan dalam pelekukan konformasi kursi, sedangkan cincin B dan C merupakan cincin yang jenuh dengan atom oksigen dan keduanya terpisah oleh jembatan peroksida. Keempat cincin dalam struktur artemisinin mempunyai hubungan ikatan yang erat satu sama lainnya. Hubungan ikatan antara cincin A-D, A-B dan C-D adalah cis, sedangkan B-D adalah trans (CCRG, 1982). Struktur dan stereokimia senyawa artemisinin dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur cincin dan stereokimia Artemisinin
(Blasko and Cordell, 1988)

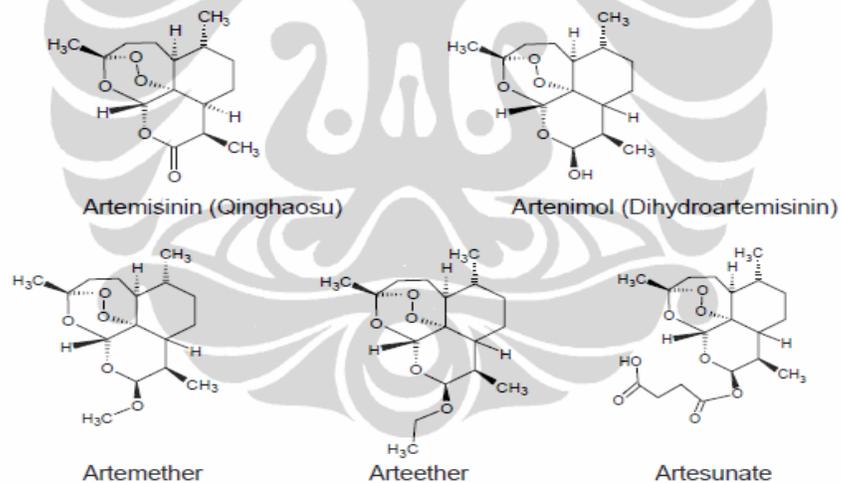
Sifat fisik senyawa artemisinin adalah merupakan suatu kristal ortorombik tak berwarna dan berbentuk jarum, titik lebur 156-157°C (QACRG, 1979), 153-154°C (Klayman et al., 1984), 150-152°C (Acton et al., 1993), 154°C (El Sohly et al., 1990), $[\alpha]_D^{17} = 66,3$ ($c=1,64$, CHCl_3) dan rapatannya 1,30 g/cm^3 . Sifat kimia artemisinin adalah sangat larut dalam pelarut nonpolar bertitik didih rendah seperti kloroform, petroleum eter, dietil eter, aseton dan etil asetat dan sedikit larut dalam air, minyak dan dapat terurai dalam pelarut yang mengandung proton dengan terbukanya cincin laktone. Stabilitas termal struktur artemisinin sampai dengan suhu 150°C dan akan terdekomposisi bila dipanaskan sampai suhu 180-200°C (Geldre et al., 1997).

2.2.4 Sintesis Senyawa Turunan Artemisinin

Modifikasi struktur molekul adalah dasar pengembangan kimia organik yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi, masa kerja lebih panjang, tingkat keamanan lebih besar, toksisitas atau

efek samping lebih rendah, lebih selektif dan lebih stabil. Dasar modifikasi molekul adalah mengembangkan struktur senyawa induk yang sudah diketahui aktivitas biologinya, kemudian disintesis dan di uji aktivitasnya (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Modifikasi molekul menurut pendekatan Topliss adalah memasukkan gugus-gugus yang memiliki sifat lipofil, elektronik dan sterik tertentu pada posisi tertentu pada suatu struktur molekul induk, dengan ramalan akan menghasilkan senyawa yang memberikan aktivitas lebih tinggi, sama atau lebih rendah dibanding aktivitas senyawa induk dan kemudian di cari jalur sintesis yang paling menguntungkan. Modifikasi molekul atau melakukan sintesis analog senyawa penuntun yaitu senyawa yang telah terbukti mempunyai aktivitas biologi, tetapi aktivitasnya lemah kurang spesifik atau toksisitasnya tinggi, merupakan metode pengembangan obat yang dewasa ini banyak sekali digunakan (Nogrady, 1985).



Gambar 2.4 Struktur derivat artemisinin

(Li et al., 2006)

Modifikasi artemisinin menjadi beberapa derivat diantaranya adalah artemimol (dihydroartemisinin), artemeter, arteeter dan artesunat (Gambar 2.4). Modifikasi struktur mengakibatkan perbedaan seperti fisika kimia dan reaktifitas kimia yang selanjutnya menyebabkan perbedaan distribusi dalam sel jaringan perjalanan sampai ke loka aksi yang berupa enzim reseptor/akseptor. Laju serta

pola metabolisme dan ekskresi senyawa tersebut. Modifikasi struktur kimia sangat kecil dapat menemukan efek biologis yang semula tersembunyi atau tertutup oleh efek yang lain. Modifikasi kadang dapat menemukan efek samping yang tidak terdugakemudian digunakan sebagai penuntun dalam rancangan obat (Sardjoko, 1993).

2.2.5 Penelitian yang Berkaitan dengan Artemisinin dan Turunannya

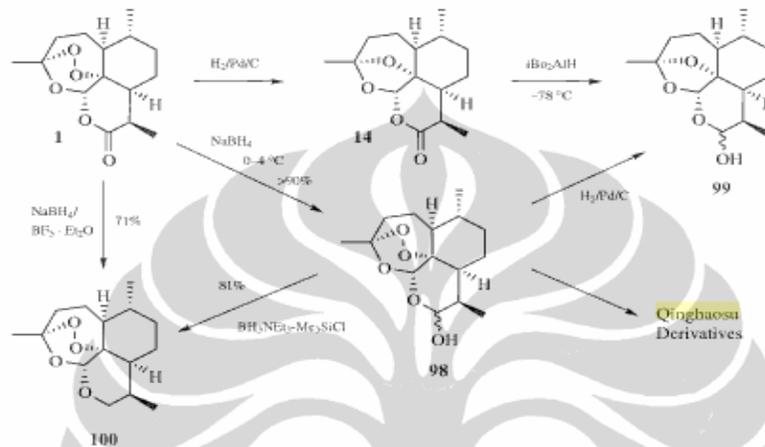
Artemisinin merupakan sebuah senyawa δ -seskuiterpen lakton dengan gugus unik endoperoksida, tidak seperti obat antimalaria sebelumnya yang merupakan senyawa alkaloid heterosiklik yang mengandung gugus nitrogen, kelarutan artemisinin terbatas baik di air maupun minyak, oleh karena itu berbagai upaya dilakukan untuk mengubah aretmisinin menjadi turunannya melalui berbagai reaksi. Beberapa derivat artemisinin yang telah berhasil di sintesis ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2 Artemisinin yang telah berhasil disintesis.

Reaktan	Pereaksi, katalis dan kondisi reaksi	Produk	Literatur
A R T E M I S I N I N	MeOH/NaBH ₄ 0-5°C	Dihidroartemisinin	Vishmakarwa, 1990
	Gas H ₂ , Pd/C	Deoksiartemisinin	Li, Y., Huang, H., Lin, WY. 2006
	K ₂ CO ₃ /MeOH	Derivat artemisinin bentuk α -epoksida	CCRG 1982
	LiAlH ₄	Sikloheksanopiran dan sikloheksan polialkohol	Wu and Zhang 1986
	10% H ₂ SO ₄ /AcOH glasial/suhu kamar-1 jam	Norseskuiterpenlakton an dekalon (γ -lakton)	CCRG 1982

Artemisinin dan derivatnya di uji baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dan

tidak semua derivat artemisinin menghambat pertumbuhan *P. falciparum*. Derivat artemisinin yang masih mempertahankan keberadaan gugus endoperoksida dalam strukturnya memberikan sifat antimalaria. Dilaporkan bahwa gugus endoperoksida ini dipercaya sebagai prasyarat untuk berperan sebagai antimalaria (Meshnick, 1994).



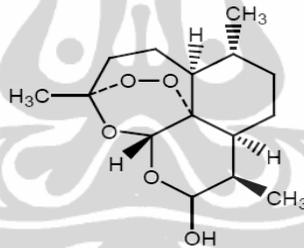
Gambar 2.5 Reaksi reduksi Artemisinin
(Li et al., 2006)

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan adalah reduksi artemisinin (gambar 2.5) menjadi dihidroartemisinin dengan reduktor $NaBH_4$ dalam metanol pada kisaran suhu $0-5^\circ C$, rendemen yang dihasilkan sebesar 75%. Reduksi artemisinin dengan reduktor $NaBH_4$ juga pernah dilakukan oleh CCRG (1982), El-Ferally et al (1990) dan Vishwakarma (1990), walaupun langkah percobaannya tidak dijelaskan, tetapi rendemen dihidroartemisinin yang dihasilkan berturut-turut 75%, 79% dan 85%. Penelitian lainnya yang mereduksi artemisinin dengan reaksi hidrogenasi menggunakan katalis Pd/C menghasilkan deoxyqinghaosu dan menyebabkan pecahnya gugus peroksida. Reduksi artemisinin dengan menggunakan $NaBH_4/BF_3 \cdot Et_2O$ menghasilkan deoxyqinghaosu dengan rendemen sebesar 71% (Li et al., 2006).

2.3 Dihidroartemisinin

Nama IUPAC dihidroartemisinin ialah [3R-(3 α ,5 α ,6 β ,8 α ,9 α ,10 α ,12 β ,12aR *)]-dekahidro-10-hidroksi-3,6,9-trimetil-3,12-epoksi-12H-pirano [4,3-j]-1,2-benzodioxepin (The Merck Index, 2001), nama lainnya adalah dihidroqinghaosu (DQHS) (Gambar 2.4). Rumus molekulnya C₁₅H₂₄O₅, berat molekul 284,35 g/mol dan analisis unsur menunjukkan 63,36% C, 8,51% H, 28,13% O. Nilai IC₅₀ dihidroartemisinin pada galur *P. falciparum* resisten terhadap klorokuin dan sensitif terhadap meflokuin adalah 0,51 ng/mL, sedangkan untuk galur *P. falciparum* sensitif terhadap klorokuin dan resisten terhadap meflokuin adalah 0,52 ng/mL (Lin et al., 1995).

Artemisinin dapat direduksi dengan reduktor NaBH₄ pada kisaran suhu 0 - 5°C dengan lama pengadukan satu jam, menghasilkan rendemen dihidroartemisinin 75% (Lin et al., 1987). Reduksi artemisinin dengan reduktor NaBH₄ juga pernah dilakukan walaupun langkah percobaannya tidak dijelaskan, tetapi rendemen dihidroartemisinin yang dihasilkan berturut-turut 75%, 79% dan 85%.



Gambar 2.6 Struktur Dihidroartemisinin
(Li et al., 2006)

Kelompok peneliti cina yang tergabung dalam QACRG melaporkan bahwa artemisinin beraksi parasitidal langsung melawan plasmodium pada tahapan eritrositik baik *in vitro* maupun *in vivo*. Hanya saja mekanisme aksinya masih menjadi perdebatan yang sangat menarik. Mekanisme aksi artemisinin dalam mengendalikan dan membunuh plasmodium diduga melalui pembentukan radikal bebas artemisinin telah dibuktikan melalui beberapa penelitian dan dalam hal ini sangat mengutamakan peran dari fungsional peroksida (Meshnick, 1994).

Terbentuknya radikal bebas artemisinin dipacu oleh ion besi II yang terikat kovalen dalam molekul hemoglobin (Klayman, 1985). Terbentuknya radikal bebas terdeteksi oleh alat voltmeter yang ditandai dengan pergeseran potensial reduksi artemisinin sebesar 0,6 Volt dan juga dapat dibuktikan dengan alat spektroskopi *electron paramagnetic resonance* (EPR). Data percobaan lain yang mendukung mekanisme aksi tersebut adalah:

1. Hasil telaahan dari beberapa pustaka oleh Klayman (1985) menyebutkan bahwa senyawa turunan artemisinin yang tidak memiliki jembatan peroksida (dikenal sebagai sumber radikal bebas oksigen), senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas anti malaria.
2. Hasil telaahan dari beberapa pustaka oleh Meshnick et al. (1996) menyebutkan bahwa penambahan senyawa oksidan atau pembangkit terbentuknya radikal seperti doksorubin mikonazol kastesin artemisinin dengan adanya konsentrasi oksigen yang tinggi ke dalam artemisinin masih dapat meningkatkan aktivitas antimalaria artemisinin, hanya saja cara kerja artemisinin dalam menghambat plasmodium berbeda dengan cara kerja senyawa oksidan, pernyataan ini didukung oleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya kerusakan sel seperti lipid peroksida setelah terbentuknya radikal bebas artemisinin.
3. Hasil telaah dari berbagai pustaka oleh Meshnick et al. (1996) menyebutkan bahwa penambahan senyawa antioksidan seperti α -tokoferol, dengan katalis ditiotreitol, asam askorbat, dan glutathione tereduksi dapat menghambat kerja artemisinin sebagai zat antimalaria. Sebaliknya jika substrat kekurangan α -tokoferol, aktivitas antimalaria dan senyawa artemisinin meningkat.

2.4 Hidrogenasi

Hidrogenasi adalah reaksi adisi ikatan rangkap dua dan rangkap tiga yang menghubungkan dua atom karbon dengan menggunakan hidrogen. Jika suatu ikatan rangkap dan suatu gugus karbonil keduanya terdapat dalam sebuah struktur, ikatan rangkap itu dapat dihidrogenasi sementara gugus karbonil tetap utuh atau dapat keduanya dihidrogenasi. Namun, gugus karbonil tidak dapat dihidrogenasi

tanpa mereduksi ikatan rangkapnya. Jika diinginkan mereduksi suatu gugus karbonil sementara ikatan rangkap karbon-karbon tetap utuh, haruslah dipilih reduksi dengan hidrida logam (Fessenden dan Fessenden, 1994).

Cara yang paling sering digunakan untuk mereduksi keton menjadi alkohol adalah dengan menghidrogenasi ikatan rangkap dan antara karbon-oksigen. Sama halnya dengan menghidrogenasi alkena, reaksi berjalan eksoterm, tapi akan berjalan lambat tanpa adanya katalis (Pine et al., 1988).

Untuk skala laboratorium, katalis yang biasanya digunakan adalah LiAlH_4 (Litium alumunium hidrida) dan NaBH_4 (Natrium borohidrida). Hanya saja, pemisahan antara produk yang dihasilkan akan lebih sulit dibandingkan jika menggunakan katalis padat seperti Ni, Pd, Pt, Rh.

Reaksi hidrogenasi dalam industri pada umumnya menggunakan gas hidrogen dan bahan yang akan dihidrogenasi sebagai reaktan dengan bantuan katalis logam untuk mempercepat laju reaksi hidrogenasi dan dilangsungkan dengan kondisi operasi pada temperatur dan tekanan tinggi.

2.5 Katalis

2.5.1 Definisi katalis

Katalis sebagai bahan atau senyawaan kimia yang dapat mempercepat laju reaksi. Katalis dapat menurunkan energi aktivasi reaksi dengan menempuh jalur alternatif untuk menghindari tahap lambat atau tahap penentu laju pada reaksi nonkatalitik, sehingga laju reaksi menjadi lebih cepat pada suhu yang sama. Berdasarkan fasa katalis dan fasa reaktan yang dikatalisa, katalis dibagi atas dua kelompok besar yaitu katalis homogen dan katalis heterogen. Katalis homogen adalah fasa katalis sama dengan fasa reaktan yang dikatalisis (misalnya asam sebagai katalis hidrolisis kanji/tepung) sedangkan katalis hidrogen, katalis dan reaktan mempunyai fasa yang berbeda (misal katalis padat untuk reaksi gas) (Atkins, 1997).

2.5.2 Logam nikel sebagai katalis

Dalam proses hidrogenasi artemisinin menjadi dihidroartemisinin, katalis yang biasanya digunakan adalah NaBH_4 atau LiAlH_4 , karena dapat mereduksi

gugus karbonil dari senyawa keton menjadi suatu gugus hidroksi. Aktivitas katalitik yang tinggi, diikuti dengan fakta bahwa hidrogen terserap kedalam pori-pori katalis selama aktivasi, menjadikan nikel sebagai katalis yang berguna untuk banyak reaksi hidrogenasi. Stabilitas termal dan strukturnya (tidak terurai pada temperatur yang tinggi) mengijinkan penggunaan katalis ini pada kisaran reaksi yang luas. Selain itu, solubilitas nikel boleh diabaikan pada kebanyakan pelarut, kecuali pada asam klorida dan densitasnya yang relatif tinggi (antara 6-7 g/cm³) juga memfasilitasi pemisahan fase cair setelah reaksinya selesai. Katalis nikel lebih umum digunakan karena harga dari katalis nikel lebih murah dibandingkan dengan katalis padat lainnya dengan perbedaan kereaktifan yang relatif tidak signifikan (Usman, 2001).

2.5.3 Penyangga katalis

Penyangga katalis yang umumnya dipilih dari oksida anorganik, digunakan untuk membantu penyebaran panas dari partikel logam sehingga dapat meningkatkan stabilitas termal dari logam dan menghindari hilangnya luas permukaan logam karena proses *sintering*. Penyangga dapat menghasilkan katalis efisiensi tinggi dengan luas area spesifik yang besar, meningkatkan stabilitas termal dan waktu hidup katalis yang disebabkan oleh:

- a. pemisahan dan dilusi partikel logam
- b. interaksi partikel logam dengan penyangga.

Disamping itu, penyangga dapat menghasilkan katalis yang lebih selektif, yang tergantung pada apakah reaksi tersebut tergolong peka terhadap struktur atau tidak. Oleh karena itu, pemilihan penyangga menjadi sangat penting dalam mendisain katalis untuk mendapatkan reaksi yang kita inginkan. Pemilihan penyangga biasanya didasarkan pada luas area spesifik, sifat porositas, kestabilan termal, aktivitas dan selektivitas (Usman, 2001).

2.6 Identifikasi

Diantara metode identifikasi dan elusidasi struktur yang diperoleh dapat dilakukan dengan metoda standar yang sudah dikenal untuk menentukan senyawa dan derivat-derivatnya, antara lain:

2.6.1 Kromatografi lapis tipis

Penggunaan kromatografi sangat membantu dalam pendeteksian senyawa dan dapat dijadikan sebagai patokan untuk proses pengerjaan berikutnya dalam menentukan struktur senyawa. Berbagai jenis kromatografi yang umum digunakan antara lain teknik kromatografi lapis tipis (KLT) sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan yang sederhana, waktu cukup singkat (15-60 menit), dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (kira-kira 0,01 g senyawa murni, 0,1 g simplisia). Di samping itu tidak diperlukan ruang besar dan teknik pengerjaan sederhana (Harmita, 2006).

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk memisahkan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut pengembang. Pada dasarnya KLT sangat mirip dengan kromatografi kertas , terutama pada cara pelaksanaannya. Perbedaan nyata terlihat pada fase diamnya atau media pemisahannya, yakni digunakan lapisan tipis adsorben sebagai pengganti kertas. Bahan adsorben sebagai fasa diam dapat digunakan silika gel, alumina dan serbuk selulosa. Partikel silika gel mengandung gugus hidroksil pada permukaannya yang akan membentuk ikatan hidrogen dengan molekul polar air. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendar flour dalam sinar ultra violet. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai (Harmita, 2006).

Pada identifikasi noda atau penampakan noda, jika noda sudah bewarna dapat langsung diperiksa dan ditentukan harga Rf. Harga Rf dihitung sebagai jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak tempuh oleh eluen (fase gerak) untuk setiap senyawa berlaku rumus sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Rf juga menyatakan derajat retensi suatu komponen dalam fase diam. Oleh karena itu Rf juga disebut faktor referensi (Harmita, 2006).

2.6.2 Spektrofotometri

2.6.2.1 Spektrometri resonansi magnetik inti (RMI) (Harmita, 2006)

Spektrometri resonansi magnet proton dapat menentukan banyaknya jenis lingkungan atom yang berbeda yang ada dalam molekul, beberapa atom hidrogen pada masing-masing jenis lingkungan hidrogen, serta berapa banyaknya atom hidrogen yang ada pada atom karbon tetangga.

Banyak inti (atau lebih tepat, inti dengan paling tidak jumlah proton atau neutronnya ganjil) dapat dianggap sebagai magnet kecil. Inti seperti proton (^1H atau H-1) dan inti karbon-13 (^{13}C atau C-13; kelimpahan alaminya sekitar 1%). Karbon -12 (^{12}C), yang dijadikan standar penentuan massa, tidak bersifat magnet. Bila sampel yang mengandung ^1H atau ^{13}C (bahkan semua senyawa organik) ditempatkan dalam medan magnet, akan timbul interaksi antara medan magnet luar tadi dengan magnet kecil (inti). Karena ada interaksi ini, magnet kecil akan terbagi atas dua tingkat energi (tingkat yang sedikit agak lebih stabil (+) dan keadaan yang kurang stabil (-) yang energinya berbeda. Spektra RMI biasanya ditentukan dari larutan substansi yang akan dianalisis. Untuk itu pelarut yang digunakan tidak boleh mengandung atom hidrogen, karena adanya atom hidrogen pada pelarut akan mengganggu puncak-puncak spektrum.

2.6.2.2 Spektrofotometri Infra Merah (Harmita, 2006)

Metoda yang dapat menentukan serta mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik, yang mana gugus fungsi dan senyawa organik dapat ditentukan berdasarkan ikatan dari tiap atom dan merupakan bilangan frekuensi yang spesifik.

Spektrofotometri Infra Red atau Infra Merah merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 – 1.000 μm atau pada bilangan gelombang 13.000 – 10 cm^{-1} . Radiasi elektromagnetik dikemukakan pertama kali oleh *James Clark Maxwell*, yang menyatakan bahwa cahaya secara fisis merupakan

gelombang elektromagnetik, artinya mempunyai vektor listrik dan vektor magnetik yang keduanya saling tegak lurus dengan arah rambatan.

Dua molekul senyawa yang berbeda struktur kimianya akan berbeda pula spektrum IR-nya. Hal ini dapat dimengerti, karena macam ikatan yang berbeda, frekuensi vibrasinya tidak sama serta walaupun macam ikatan sama tetapi berada dalam senyawa yang berbeda, frekuensi vibrasinya juga berbeda (karena dua ikatan yang sama tersebut berada dalam lingkungan yang berbeda) (Harmita, 2006).

2.6.2.3 Spektrofotometri Massa

Spektrometer massa adalah suatu instrumen yang menghasilkan berkas ion dari suatu zat uji, memilah ion tersebut menjadi spektrum sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan (m/e) dan merekam kelimpahan reaktif tiap jenis ion yang ada (Harmita, 2006). Spektroskopi massa ini untuk mengetahui berat molekul senyawa dan ditunjang dengan adanya fragmentasi ion molekul yang menghasilkan pecahan-pecahan spesifik untuk suatu senyawa berdasarkan m/e dan masing-masing fragmen yang terbentuk. Terbentuknya fragmen-fragmen dengan terjadinya pemutusan ikatan apabila disusun kemudian akan dapat menentukan kerangka struktur senyawa yang diperiksa.

2.7 Uji Aktivitas

Efektivitas obat antimalaria dinilai dari sensitivitas atau resisitensi parasit terhadap obat tersebut. Adanya resisitensi parasit malaria terhadap obat antimalaria disebabkan oleh timbulnya kemampuan sejenis parasit untuk terus hidup dalam tubuh manusia, berkembang biak dan menimbulkan gejala penyakit walaupun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan konsentrasi yang lebih tinggi, yang masih dapat ditolerir oleh pemakai obat (Tjitra, 2000).

Penentuan resisitensi *P. falciparum* dapat dilakukan dengan cara *in vitro* (tes makro dan mikro) dan *in vivo*. Tujuan kedua cara ini berbeda, cara *in vitro* bertujuan menilai kemampuan parasit untuk terus hidup atau berkembang biak pada konsentrasi obat tertentu. Tujuan lain, cara *in vitro* dapat menunjukkan

timbulnya resistensi terhadap beberapa jenis obat antimalaria seperti klorokuin, sulfadoksin-primetamin, kina, amodiakuin dan meflokuin karena obat-obat dapat diuji serempak pada saat yang bersamaan.

Pada penelitian ini, penentuan efektivitas zat antimalaria terhadap pertumbuhan *P. falciparum* dilakukan dengan metode *in vitro* mikro. Keuntungan metode *in vitro* untuk mempelajari efektivitas obat antimalaria antara lain karena (Trager dan Jensen, 1976):

1. Penggunaan biakan memungkinkan untuk mempelajari aktivitas intrinsik obat secara lebih hemat dan lebih cepat.
2. Hanya memerlukan obat dalam jumlah kecil
3. Pengaruh metabolisme hospes dihilangkan
4. Efektivitas obat dapat langsung diamati
5. Memudahkan skrining obat antimalaria baru
6. Dimungkinkan pemberian konsentrasi obat yang lebih tinggi untuk mempelajari sifat toksisitas dari obat tersebut
7. Memungkinkan pembuatan vaksin malaria.

Uji aktivitas antimalaria dilakukan secara *in vitro* meliputi pembiakan *P. falciparum*, sinkronisasi dan evaluasi hasil pengujian aktivitas antimalaria dari zat yang diberikan secara tunggal ataupun kombinasi (Purwantiningsih, 2003).

Persen penghambatan senyawa uji terhadap pertumbuhan *P. falciparum* dihitung dengan cara membandingkannya dengan kontrol dan dirumuskan sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = 100\% - [(X_e/X_k) \times 100\%]$$

Keterangan:

X_e = Jumlah skizon hidup dengan minimal 3 inti terhadap 200 aseksual *P. falciparum* pada sumur uji

X_k = Jumlah skizon hidup dengan minimal 3 inti terhadap 200 aseksual *P. falciparum* pada sumur kontrol

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan

Bahan yang digunakan untuk preparasi katalis adalah titanium isopropoxide (Fluka Chemica), nikel nitrat (E. Merck), asam sulfat (E. Merck), asam nitrat (E. Merck), n-propanol (E. Merck) dan CTAB, cetyltrimethyl-ammonium-bromide (E. Merck). Untuk reaksi sintesis dan pemurniannya menggunakan artemisinin hasil isolasi dari *Artemisia annua* yang diperoleh dari PT. Sinkona Indonesia Lestari, gas hidrogen HP, metanol pa (E. Merck), etil asetat, n-heksan, toluen, asam format, kloroform, reagen p-anisaldehyd sebagai penampak noda KLT, DMSO (dimetil sulfaoksida), Silika gel 60 GF 254 (70-230 mesh, Merck), lempeng KLT (E. Merck 05554), RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), hipoksantin (Sigma), larutan Giemsa, gentamisin (Sigma), klorokuin (Sigma), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid). Kultur *Plasmodium falciparum* yang digunakan pada penelitian ini adalah *Plasmodium falciparum* (FRC3) dan Kultur *Plasmodium falciparum* (3D7)

3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat refluks, magnetic stirrer, hot plate, oven vacuum, alat reduksi katalis (Tube furnace 21100), termometer, pH indikator, XRD, reaktor hidrogenasi, penguap putar (*rotary evaporator* Buchii), peralatan kromatografi kolom, spektrofotometer infra merah (Perkin Elmer 16 PC, FTIR, Prestige-21 Shimadzu), resonansi Magnet Inti (500 MHz, Jeol), kromatografi cair- Spektrometri Massa Mariner Biorad (70 ev), alat penentuan titik leleh Fisher Scientific serial 903N 0056. LAF (*Laminar air flow* Forma Scientific), inkubator (Heraeus), *candle jar* Scott. Mikroskop binokuler (Axioskop, Zeiss), kaca objek, Pipet mikro (Eppendorf) dan alat-alat gelas laboratorium.

3.3 Lokasi

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia di Serpong

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu preparasi katalis, sintesis melalui reaksi hidrogenasi, identifikasi senyawa dan uji aktivitas senyawa yang dihasilkan.

3.4.1 Preparasi katalis (Jenie, 2009)

Preparasi katalis dilakukan dengan tahap sebagai berikut: 14,45 n-propanol diaduk pada suhu 0°C selama beberapa menit kemudian ditambahkan Titanium Iso Propoxide sebanyak 9,25 ml. Kedua larutan tersebut kemudian dicampurkan dengan pengadukan konstan lalu ditambahkan HNO₃ hingga pH campuran mencapai 3. Campuran di refluks selama 5 jam pada suhu 70°C lalu ditambahkan air hingga gel terbentuk. *Wet gel* yang terbentuk dilakukan proses *aging* dan diimersikan surfaktan didalam n-propanol pada temperature ruangan selama 24 jam. Selanjutnya didekantasi dan dikeringkan didalam oven selama semalam pada suhu 70°C (*surfactant modified gel*). Gel kemudian dikalsinasi pada suhu 500°C selama 8 jam menggunakan furnace. Selanjutnya diimpregnasi dengan Ni(NO₃)₂ dengan perbandingan *equimolar* dan diaduk pada suhu 50°C sampai air menguap dan terbentuk *slurry*. Dry gel yang terbentuk dikeringkan selama 3 jam pada suhu 70°C. Gel kemudian dikalsinasi pada suhu 500°C selama 8 jam menggunakan furnace. Selanjutnya dilakukan proses reduksi katalis pada suhu 300°C selama 4 jam.

3.4.2 Hidrogenasi

Sejumlah 100 mg (0,35 mmol) artemisinin murni ditimbang seksama kemudian ditambahkan 30 ml metanol dan 10 mg katalis Ni/TiO₂, dimasukkan dalam reaktor dan dipanaskan selama 3 jam pada suhu konstan 100°C. Setelah itu, dialirkan gas hidrogen pada suhu yang sama selama 5 jam pada tekanan konstan 5 bar. Produk kemudian disaring untuk

dipisahkan dari katalis dan dikeringkan. Filtrat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi kolom kemudian diuji dengan dengan kromatografi lapis tipis dan titik leleh.

3.4.3 Analisis kualitatif dengan KLT

Eluen toluen-etil asetat-asam format (7 : 3 :1) dijenuhkan dalam bejana kromatografi. Artemisinin dan senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam kloroform. Masing-masing larutan tersebut ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis dan kemudian dielusi sampai garis batas. Bercak yang dihasilkan dibandingkan antara senyawa hasil sintesis dengan senyawa pemula yaitu artemisinin dan dihidroartemisinin standar. Untuk derivatisasi hasilnya di semprot dengan reagen anisaldehyd-asam sulfat.

Pembuatan reagen pendeteksi, *p*- Anisaldehyd (0.5 ml) dicampur dg 10 ml asam asetat glasial, 85 ml metanol (MeOH) dan 5 ml asam sulfat.

3.4.4 Pemurnian hasil sintesis dengan kromatografi kolom

Pemisahan senyawa kimia dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel. Kolom dipasang tegak lurus pada statip dan dibilas dengan cara eluasi. Silika gel yang telah disuspensikan dengan n-heksana dimasukkan kedalam kolom. Biarkan cairan eluasi mengalir sampai silika gel memadat dan tidak ada lagi gelembung udaranya. Hasil sintesis yang telah dipekatkan dilarutkan dan ditambahkan silika gel dengan berat yang sama dan diuapkan sampai kering. Hasil preabsorpsi dimasukkan kedalam kolom lalu dielusi dengan n-heksana, kemudian kepolaran eluen ditingkatkan dengan menambahkan etil asetat secara bertahap. Komposisi eluen yang digunakan adalah n-hesana – etil asetat (1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan 50%). Larutan yang keluar dari kolom ditampung dengan menggunakan botol vial 10 mL dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Larutan dengan nilai Rf yang sama digabung dan diuapkan pelarutnya.

3.4.5 Identifikasi Zat

3.4.5.1 Titik leleh senyawa sintesis

Senyawa hasil sintesis yang telah dimurnikan ditentukan titik leleh dengan alat penentuan titik leleh, hasil yang diperoleh dicatat.

3.4.5.2 Spektrofotometri Infra merah

Sejumlah lebih kurang 1 mg zat uji (hasil hidrogenasi) ditimbang, kemudian digerus dengan KBr yang telah dikeringkan selama 24 jam pada suhu 105°C dibuat baseline menggunakan KBr, kemudian campuran yang telah digerus dianalisis pada bilangan gelombang 4000 cm^{-1} sampai dengan 400 cm^{-1} . Spektrum yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum serapan senyawa standar.

3.4.5.3 Spektrometri resonansi magnetik inti (RMI)

Spektrum resonansi magnetik inti (RMI) diukur dengan menggunakan spectrometer RMI untuk menentukan jumlah dan jenis proton didalam molekul dari senyawa tersebut. Pada pengukuran $^1\text{H-NMR}$ digunakan pelarut CDCl_3 dengan standar internal tetrametilsilan (TMS).

3.4.5.4 Uji aktivitas senyawa yang dihasilkan

Uji ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas isolat murni terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. dan aktivitas hambatan 50%.

Persiapan kultur parasit. Kultur parasit *P. falciparum* klon 3D7 dipelihara secara *in vitro* dengan metode standar (Trager dan Jensen, 1976). Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C, dibiakkan dalam medium RPMI-1640 yang ditambahkan dengan 5 % hematokrit dan 10 % AB⁺ serum darah manusia.

Pembuatan serum dan medium. Serum diperoleh dari darah yang diambil secara aseptik dari sukarelawan yang tidak terinfeksi malaria. Darah tersebut disimpan pada tabung 50 ml yang tidak mengandung antikoagulan. Kemudian serum dipisahkan dari darah dengan sentrifugasi pada 2000 g selama 5 menit. Selanjutnya, serum diinaktivasi pada suhu 56°C selama 1 jam, dan disimpan dalam suhu -20°C sampai digunakan. Medium kultur RPMI-1640, diberi tambahan suplemen gentamisin 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, hipoksantin 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid), dan larutan tersebut dipertahankan pada pH 7,4 dengan menambahkan larutan natrium bikarbonat. Pembuatan larutan standar antimalaria dan senyawa uji, dilakukan dengan segera sebelum percobaan dengan cara melarutkan klorokuin kedalam DMSO 10^{-2} M. Senyawa uji dilarutkan dengan pelarut yang sama untuk mencapai dosis yang diinginkan.

Uji aktivitas anti malaria isolat murni *in vitro*. Uji aktivitas antimalaria isolat murni menggunakan plat kultur (10 x 10 cm) yang memiliki 24 lubang, masing masing lubang dengan kapasitas 3 mL). Kedalam masing masing sumur berturut turut diisi larutan RPMI-1640, 10 % serum dan 50 μL RBC⁺ (red blood concentrate) yang mengandung parasit *P. falciparum* serta isolat yang akan diuji sedemikian rupa sehingga volume akhir mencapai 1 mL. Plat kultur disimpan dalam inkubator suhu 27°C dan diamati setiap hari selama 3 hari. Untuk percobaan standar, 50 μL klorokuin dalam variasi konsentrasi 10^{-5} - 10^{-9} M, secara berurutan dimasukkan kedalam 5 sumur. Selanjutnya 50 μL larutan senyawa uji pertama dengan variasi konsentrasi 10^{-5} – 10^{-9} M dimasukkan kedalam 5 sumur berikutnya.

Pertumbuhan parasit dimonitor tiap hari (H_0 sampai dengan H_3), dengan cara mengoleskan 15 μL kultur parasit pada gelas objek dan kemudian dibuat apusan. Apusan darah tersebut difiksasi dengan metanol, dikeringkan dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% selama 10 menit. Setelah dibilas dan dikeringkan, gelas objek tersebut diperiksa dibawah

mikroskop binokuler dan parasitemia dihitung di bawah perbesaran 1000x. Data respon konsentrasi isolat murni terhadap pertumbuhan parasit dianalisis dengan regresi linier menggunakan program komputer Xp Sigma-plot untuk menentukan konsentrasi penghambatan 50 % (IC₅₀). IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat pertumbuhan parasit 50% relative terhadap kontrol.

Perhitungan aktivitas antimalaria: perhitungan ini dilakukan untuk menentukan % parasitemia dan efek inhibisi fraksi dan isolat murni yang diuji.

Persen parasitemia adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dibagi dengan jumlah eritrosit total dikali 100%. Perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persen parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi parasit}}{\text{Jumlah total eritrosit}} \times 100\%$$

Persen inhibisi diperoleh dari pengurangan antara parasitemia kontrol parasitemia control dan parasitemia perlakuan, dibagi dengan parasitemia kontrol dan dikalikan dengan 100 % atau seperti ditunjukkan pada persamaan berikut:

$$\text{Persen inhibisi} = \frac{\text{Parasitemia kontrol} - \text{parasitemia perlakuan}}{\text{Parasitemia kontrol}} \times 100\%$$

Konsentrasi hambatan 50 % fraksi dan isolat murni ditentukan dengan analisis regresi linier menggunakan program komputer Xp Sigma-plot untuk menentukan konsentrasi penghambatan 50 % (IC₅₀). Berdasarkan perpotongan garis 50 %, kurva yang dibentuk antara persen pertumbuhan sumbu-y dan ini menggunakan analisis regresi linier program komputer Xp Sigma-plot.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan dan Karakterisasi Katalis

4.1.1 Pembuatan Katalis

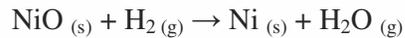
Larutan $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 M sebanyak 31 mL yang ditambahkan dengan kecepatan 0.5 mL/detik kedalam suspensi penyangga TiO_2 pada suhu 70°C sambil terus diaduk, menghasilkan katalis nikel seberat 2.4 gram (Lampiran 4.1a). Secara teoritis, proses tersebut menghasilkan katalis Ni/ TiO_2 dengan kandungan nikel sebesar 8%. Proses tersebut berlangsung selama 6-8 jam, dengan bubuk katalis yang dihasilkan berwarna hijau muda. Metode pembuatan katalis ini disebut dengan metode impregnasi basah (Pinna, 1998), dimana larutan prekursor yang digunakan melebihi volume pori penyangga. Campuran kemudian dibiarkan beberapa saat sambil terus diaduk. Setelah semua pelarutnya habis, bubuk katalis kemudian dikeringkan. Oleh karena itu, konsentrasi prekursor logam pada penyangga tidak hanya tergantung pada konsentrasi larutan dan volume pori penyangga tetapi juga tergantung pada jenis atau konsentrasi sisi adsorpsi yang ada pada permukaan. Metode ini mempunyai keuntungan dibandingkan dengan metode lain, diantaranya adalah lebih sederhana dan ekonomis dan reproduibilitas logam yang baik.

Serbuk katalis setelah impregnasi kemudian dikeringkan di dalam oven sehingga diperoleh katalis segar. Pengerinan bertujuan untuk menghilangkan pelarut yang digunakan pada tahap impregnasi (Pinna, 1998).

Setelah pengeringan, bubuk katalis segar diberlakukan di bawah aliran gas oksigen atau dengan suhu yang relatif tinggi. Proses ini disebut kalsinasi. Reaksi yang terjadi pada waktu kalsinasi adalah proses oksidasi prekursor logam untuk mendapatkan oksida logam. Pada tahap kalsinasi, katalis dipanaskan selama 6 jam pada suhu 500°C . Pada tahap ini terjadi pengeluaran produk-produk gas (biasanya air dan CO_2) yang tidak hilang pada saat pengeringan, selain itu untuk melakukan dekomposisi nitrat dan membentuk nikel oksida sesuai dengan reaksi sebagai berikut (Usman, 2001):



Reduksi dilakukan dibawah aliran gas H₂ selama 4 jam pada suhu 120°C dan 350°C (lampiran 4.1b). Reduksi bertujuan untuk mengubah senyawa prekursor nikel atau oksidanya menjadi keadaan metalik. Proses ini dikenal juga dengan sebagai aktivasi katalis., dengan persamaan berikut:



Disamping itu, hidrogen juga dapat menghilangkan uap air pada permukaan katalis melalui pembentukan hidroksilat pada permukaan.

4.1.2. Karakterisasi Katalis

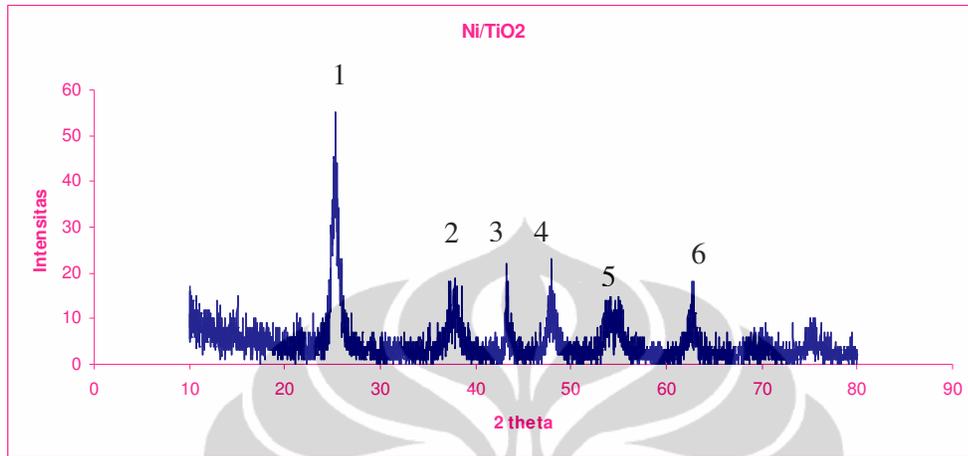
Perlakuan seperti pengeringan, kalsinasi dan reduksi berpengaruh terhadap luas permukaan, spesies nikel dan ukuran partikel nikel pada katalis yang dibuat (Usman, 2001). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap luas permukaan dan difraksi sinar-x katalis, sehingga karakteristik katalis akibat perlakuan tersebut dapat diketahui.

4.1.2.1 Difraksi Sinar-X

Pola difraksi sinar-X katalis dilakukan dengan XRD Xpert Philip. Sebanyak sekitar 2 g bubuk katalis ditempatkan pada plat sampel, lalu dianalisa. Sudut 2θ yang diukur adalah 10-80° dengan waktu pengukuran 23 menit, sumber CuKα, target Cu dan λ = 1.54 nm. Puncak-puncak pada difraktogram dibandingkan dengan data base komputer untuk mengetahui jenis kristal. Analisa difraksi sinar-x dilakukan untuk mengetahui struktur kristal dan menentukan pola difraksi dari sampel katalis. Ukuran Crystallite dihitung menggunakan persamaan Debye-Scherrer

Gambar 4.3 menunjukkan difraktogram katalis Ni/TiO₂ setelah pengeringan, kalsinasi dan reduksi. Pada difraktogram katalis Ni/TiO₂ setelah reduksi, diidentifikasi adanya puncak karakteristik Ni pada daerah 2θ = 25.34. Dari hasil perhitungan menggunakan persamaan Debye-Scherrer diperoleh ukuran crystallite sebesar 8,4 nm. Hal ini menunjukkan bahwa katalis setelah perlakuan

kalsinasi dan reduksi tampak bahwa katalis Ni/TiO₂ mempunyai intensitas yang tinggi pada sudut 25.34.



Gambar 4.1 Kromatogram XRD katalis Ni/TiO₂

Dari data base komputer diketahui bahwa penyanga TiO₂ murni mempunyai bentuk kristal anatase sesuai dengan pola difraksi TiO₂ pada ASTM 04-0477 karena ditemukan puncak pada daerah $2\theta = 25.34^\circ$ (100%, 1), 47.88° (24.9%, 4) dan 54.14° (24.4%, 5). Perlakuan kalsinasi menyebabkan timbulnya puncak karakteristik NiO pada $2\theta = 37.34^\circ$ (26.7 %, 2), 43.32° (24.4 %, 3), 62.86° (28.9 %, 6). Pada identifikasi puncak karakteristik Ni setelah reduksi ditemukan pada $2\theta = 43.32^\circ$ (24.4 %, 3) dan 54.14° (24.4 %, 3) sesuai dengan pola difraksi Ni pada ASTM 04-0850. Dari data tersebut dapat diperkirakan bahwa proses reduksi yang terjadi belum berjalan sempurna dalam mengubah oksida nikel menjadi logam nikel, meskipun pada sudut 43.32° dan 54.14° telah tampak pembentukan Ni hasil reduksi, namun dengan intensitas yang masih rendah. Hal ini mungkin karena persentase Ni pada TiO₂ masih terlalu besar.

Dengan menggunakan nano katalis ini selektivitas dan efisiensi yang tinggi dapat ditingkatkan karena mampu bekerja pada level energi yang lebih rendah. Dimana, aktivitas katalis sangat ditentukan oleh ukuran pori dari katalis tersebut. Logam oksida berpori polikristal fasa tunggal atau multifasa dengan tipe ukuran partikel 1 hingga 100 nm adalah sangat penting dalam klas nano material, karena perbandingan luas permukaan/ volume dari material tersebut akan naik berlipat-lipat sehingga material tersebut sangat berguna untuk penerapan pada proses yang berhubungan dengan

permukaan. Pemanasan pada suhu 500°C memperlihatkan terbentuknya kristal TiO₂ dalam bentuk anatase (Laksono, 2008).

4.1.2.2 Luas permukaan spesifik

Luas permukaan spesifik, S_{BET} dihitung dengan menggunakan persamaan BET, sedangkan distribusi ukuran pori diperoleh melalui analisa kurva adsorpsi menggunakan metoda perhitungan BJH. Dari hasil analisa diperoleh bahwa katalis TiO₂ yang belum diimpregnasi nikel mempunyai luas permukaan spesifik sebesar 4.71 m²/g dan volume pori total 0.0019 cm³/g. Perlakuan impregnasi Ni dan proses reduksi, memperkecil luas permukaan spesifik, akan tetapi memperbesar volume pori total yaitu berturut-turut menjadi 47.36 m²/g dan 0.102 cm³/g (Jenie, 2009).

Tabel 4.1 Analisa BET sampel katalis

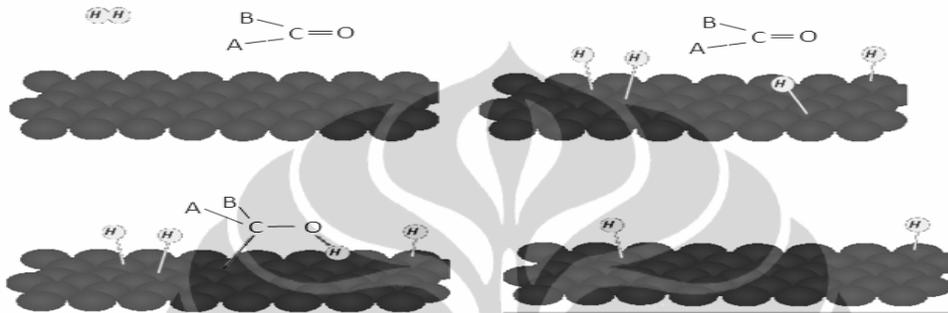
Sampel	Luas Permukaan Spesifik (m ² /g)	Volume Pori Total (cm ³ /g)
TiO ₂	4.71	0.0019
TS, Ni 8% red	47.36	0.102

Luas permukaan spesifik katalis mengalami perubahan setelah proses impregnasi, kalsinasi dan reduksi, karena selama proses tersebut terjadi penambahan pelarut atau perlakuan suhu yang akan menyebabkan adsorpsi pelarut atau perubahan spesies nikel serta ukuran kristal nikel. Penurunan luas permukaan ini disebabkan juga oleh besarnya diameter partikel Ni (Usman, 2001).

4.2 Sintesis Derivatif Artemisinin Dengan Proses Hidrogenasi Menggunakan Katalis Ni/TiO₂

Sintesis senyawa dihidroartemisinin melalui reaksi reduksi antara artemisinin dengan menggunakan katalis logam Ni/TiO₂ dalam pelarut metanol dihidrogenasi selama 5 jam pada suhu 100°C dan tekanan 5 Bar didalam reaktor hidrogenasi (lampiran 2).

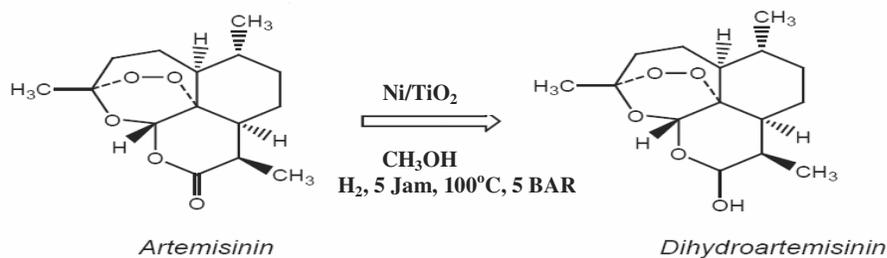
Aktivitas yang terjadi selama reaksi hidrogenasi dapat dijelaskan sebagai berikut (Gambar 4.2), pada mulanya katalis logam akan memisahkan gas hidrogen menjadi atom-atomnya dan menstabilisasi atom-atom hidrogen ini dalam bentuk radikalnya, sehingga terbentuk H_2 dan $\bullet H$ (radikal). Atom hidrogen yang telah teraktivasi ini bersifat sangat reaktif dan akan mencoba untuk menuju kestabilan yang baru dengan orbital s penuh (dengan 2 elektron).



Gambar 4.2 Aktivitas pada proses hidrogenasi

Sementara itu, secara simultan ikatan rangkap pada artemisinin juga akan dipecah oleh katalis logam dan mengikat artemisinin ke permukaan katalis. Setelah itu, atom hidrogen akan menarik elektron dari zat kimia lain yang berdekatan (dimana dalam kasus hidrogenasi artemisinin, hidrogen akan memecah ikatan antara atom karbon ke-10 dari artemisinin dengan oksigen dan menggantikan posisi di antara kedua ikatan itu dengan ikatan baru dengan atom hidrogen).

Reaksi yang terjadi pada proses modifikasi artemisinin menjadi dihidroartemisinin menggunakan katalis Ni/TiO_2 melalui proses hidrogenasi adalah sebagai berikut:



Pada akhir reaksi hidrogenasi, menghasilkan larutan berwarna kekuningan. Penguapan pelarut dengan rotavapor menghasilkan padatan berminyak

berwarna putih kekuningan seberat 99.7 mg (99%). Padatan berminyak ini masih merupakan campuran senyawa target dan beberapa senyawa lainnya. Hasil pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut heksana dan etil asetat diperoleh senyawa target berupa kristal putih yang larut sempurna dalam metanol dan kloroform sebesar 18.3 mg (16.58%) dengan titik leleh 151-153°C.

Analisis KLT dengan pelarut toluen-etil asetat-asam formiat (7:3:1) memberikan noda 1 spot. Hasil pewarnaan dengan reagen p-anisaldehyd memberikan spot berwarna pink kekuningan dengan R_f 0.44. Molekul target lebih polar dibandingkan artemisinin. Dari data KLT memberikan indikasi bahwa senyawa target murni karena pada kromatogramnya hanya muncul satu spot (Gambar 4.4). Untuk mengetahui kemurnian senyawa ini lebih lanjut maka perlu dianalisis dengan metode kromatografi lainnya. Senyawa hasil sintesis dianalisis dengan kromatografi cair yg ditandem spektrometer massa (LC-MS), spektrofotometer Infra Merah (FT-IR) dan spektromter NMR. Spektrum FT-IR digunakan untuk menentukan jenis gugus fungsi yang terdapat di dalam molekul senyawa. Spektrum NMR digunakan untuk menentukan jumlah dan posisi proton serta karbon dalam senyawa hasil sintesis. Sedangkan spektrum massa digunakan untuk menentukan berat molekul senyawa. Kromatogram yang diperoleh dibandingkan dengan kromatogram bahan baku yaitu artemisinin.

4.2.1 Pengujian awal dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebagai langkah awal pemisahan dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil sintesis dilakukan uji KLT dengan fase diam silika gel F_{254} dan fase gerak (eluen) toluen-etil asetat-asam formiat terdapat enam spot. Spot-spot yang ada dapat dilihat jelas dan disemprot dengan reagen anisaldehyd, spot-spot tersebut berwarna pink kekuningan (Lampiran 4.4). Perubahan harga R_f produk reaksi dibandingkan senyawa awal menunjukkan bahwa reaksi sintesis senyawa X telah berlangsung.

4.2.2 Pemurnian dengan Kromatografi Kolom

Hasil sintesis masih terdiri atas senyawa target dan beberapa senyawa lainnya. Oleh karena itu dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom dengan

diameter 0.5 cm dan panjang kolom 30 cm. Bagian dasar kolom yang telah dicuci bersih dikeringkan dan diberi sedikit kapas, eluen dilewatkan ke dalam kolom untuk membasahi kapas tersebut. Disiapkan 300 mg silika gel (E. Merck 7733) sebagai fase diam. Silika gel ini diambil sedikit demi sedikit dan dilarutkan dengan n-heksana didalam beaker gelas kecil dan diaduk sampai homogen dan tidak ada gelembung udara. Silika gel ini dimasukkan secara perlahan menggunakan corong kedalam kolom sampai habis.

Sampel hasil sintesis dicampur dengan silika gel, dilarutkan sedikit dengan n-heksana kemudian dimasukkan kedalam kolom. Eluen dimasukkan (fase gerak) dimulai dari n-heksana 100 % hingga perbandingan n-heksana : etil asetat 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan 50%. Larutan yang keluar dari kolom ditampung dalam vial masing-masing 10 mL. Larutan pada setiap vial diuji dengan KLT.

Tabel 4.2 Nilai Rf masing-masing spot hasil sintesis

No Spot	Nilai Rf	Warna pengamatan dengan penyemprotan reagen anisaldehyd	Keterangan
1	0.74	Pink kekuningan	Artemisinin
2	0.43	Pink kekuningan	Dihidroartemisinin standar
X ₁	1	Abu-abu	Sisa
X ₂	0.76	Pink kekuningan	Sisa
X ₃	0.59	Pink abu-abu	Sisa
X ₄	0.44	Pink kekuningan	Senyawa target
X ₅	0.32	Kuning	Sisa
X ₆	0.1	Kuning	Sisa

Senyawa yang mengandung noda tunggal dengan R_f 0.44 (X₄) dikumpulkan, karena senyawa ini merupakan senyawa target yang memiliki R_f yang hampir sama dengan standar dihidroartemisinin. Senyawa tersebut lalu dipisahkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Senyawa target yang diperoleh dari hasil pemurnian berupa kristal jarum halus berwarna putih seberat 18.3 mg (16.58%).

Hasil yang diperoleh pada reaksi ini belum cukup tinggi jika dibandingkan dengan produk reaksi reduksi umumnya menggunakan NaBH_4 maupun menggunakan katalis Pd. Hal ini disebabkan belum optimalnya kondisi reaksi yang digunakan. Keberhasilan suatu reaksi reduksi selain ditentukan oleh jenis reduktor, faktor-faktor lain seperti pelarut, waktu kontak antara substrat dan reduktor, suhu reaksi, lama waktu dan kecepatan pengadukan juga akan berpengaruh terhadap rendemen yang dihasilkan (Purwantiningsih, 2003).

4.2.3 Spektroskopi LC-MS

Analisis senyawa target dengan kromatografi cair yang ditandem dengan MS memberikan satu puncak dengan waktu retensi (t_R) 2.2 menit. Kromatogram senyawa target ditampilkan pada gambar 4.5a.

Setelah pemisahan dengan kromatografi cair, *Electrospray ionization mass spectrometry* (ESI-MS) dilakukan untuk menentukan ion-ion dan fragmen-fragmen pada molekul. Dimana pada ESI-MS ini digunakan mode ion positif yang ditandai dengan adanya pembentukan molekul dengan penambahan ion-ion seperti $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, $[\text{2M}+\text{K}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ dan ion-ion positif lainnya (Wang et al., 2005).

Hasil pengukuran LC-MS senyawa target mempunyai rumus molekul $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_5$ dan berat molekul 284 g/mol. Hal ini dibuktikan bahwa senyawa ini memberikan puncak ion molekul pada 285.28 $[\text{M} + 1]^+$, tetapi puncak ini tidak signifikan dan bukan merupakan puncak yang dominan. Puncak ion molekul yang dominan dengan intensitas 100% muncul sebagai $[\text{2M} + \text{Na}]^+$ yaitu pada m/z 590.85 $[\text{2M} + 23]^+$ seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.5b. Hasil pemeriksaan spektrum massa senyawa target, puncak ion molekul muncul pada m/z 284.29 tetapi sangat rendah dan disertai munculnya $[\text{M} + \text{H}]^+$ pada ion molekul 285.28. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan pada analisis artemisinin pada *Artemisia annua* L. menggunakan LC-MS, dimana puncak ion molekul yang dominan adalah pada $[\text{M} + \text{Na}]^+$ dan $[\text{M} + \text{H}]^+$ tidak muncul sebagai puncak ion molekul yang signifikan karena puncak ion tersebut tidak dominan pada penentuan dengan jenis ion positif (Wang et al., 2005).

4.2.4 Analisis Spektroskopi Infra Merah (FT-IR)

Pengukuran spektroskopi Infra merah FT-IR untuk senyawa dihidroartemisinin menggunakan pellet KBr, menunjukkan gugus-gugus fungsi dengan bilangan gelombang yang ditampilkan pada spektrum dan tabel 4.3.

Tabel 4.3 Perbandingan Bilangan Gelombang (cm^{-1}) antara Senyawa X terhadap Artemisinin

No	Artemisinin	Senyawa X	Literatur	Gugus Fungsi
1	-	3371.57	3350 – 3200	Vibrasi O-H Bebas
2	-	-	3100 – 3000	Vibrasi ulur C-H Alkena
3	2908.65 – 2846.93	2929.06; 2850.79	2900	Vibrasi ulur C-H Alifatik
4	1735.93	-	1715 – 1780 1735 – 1770	Vibrasi ulur C-O Siklik Keton Vibrasi ulur C-O Siklik Ester
5	-	-	1680 – 1600	Vibrasi ulur C=C Alkena
6	1454.33	1442.75	1465; 1450	Vibrasi Tekuk –CH ₂
7	1382.96	1377.17	1375	Vibrasi Tekuk –CH ₃
8	1224.80; 1182.36	1034.14	1300 – 1000	Vibrasi ulur C-O
9	1116.78; 881.47 833.28	1091.71; 875.68 844.82	1150 – 1085 950 – 810	Vibrasi ulur C-O-O-C-
10	995.27; 1027.00	985.62; 1024.20	1200 – 800	Vibrasi ulur C-C Siklik
11	-	-	1000 – 650	Vibrasi tekuk =C-H

Pada spektrum IR artemisinin muncul serapan berfrekuensi 1735.93 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur C=O dari vibrasi ulur C=O siklik keton dan siklik ester (lakton) dan pada senyawa target ternyata tidak ada lagi serapan pada daerah dengan frekuensi tersebut.

Pada penelitian ini, proses perubahan artemisinin menjadi senyawa target melalui reaksi hidrogenasi ditandai dengan munculnya serapan pada daerah frekuensi 3371.57 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur dari gugus -OH . Hal ini didukung dengan munculnya pita serapan dari vibrasi ulur C-O pada frekuensi 1034.14 cm^{-1} . Vibrasi ulur gugus -OH dihidroartemisinin muncul pada 3390 cm^{-1} (El-Feraly et al., 1990).

Reaksi hidrogenasi tidak merusak keberadaan gugus endoperoksida. Hal ini terbukti dengan masih terdapatnya serapan vibrasi ulur dari C-O-O-C pada frekuensi 1091.71 ; 875.68 ; 844.82 cm^{-1} . Data ini menunjukkan bahwa senyawa target ini mengandung gugus hidroksil (-OH) dan peroksida (C-O-O-C).

4.2.5 Data Analisis Pergeseran Kimia (δ , ppm) dari Spektrum NMR

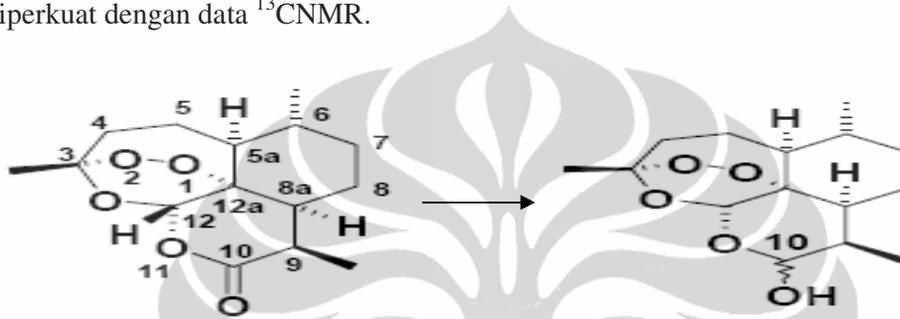
Untuk melengkapi data pengukuran spektroskopi, telah dilakukan pengukuran spektrum NMR. ^{13}C NMR digunakan untuk mengetahui jumlah atom karbon dan menentukan jenis atom karbon pada senyawa tersebut. Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa target mengandung 15 atom karbon, yang terdiri dari 3 gugus metil (CH_3), 4 gugus metilen (CH_2), 5 gugus metin (CH), 3 atom C quartener. Pada spektrum tersebut menunjukkan adanya perubahan nilai geseran kimia pada C-10 yaitu pada artemisinin δ 172.24 ppm sedangkan pada senyawa target 96.60 ppm. Hal ini menunjukkan adanya perubahan gugus karbonil menjadi gugus hidroksil sesuai dengan nilai prediksi nilai geseran kimia pada dihidroartemisinin menggunakan chemdraw. Pada spektrum ^{13}C NMR ini juga dapat dilihat adanya tiga gugus metil pada 3-Me, 6-Me dan 9-Me dengan nilai geseran kimia berturut-turut 13.37, 20.56 dan 26.26 ppm. Perbandingan nilai geseran kimia antara senyawa target dan artemisinin dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Perbandingan nilai geseran kimia senyawa target terhadap artemisinin

No	ARTEMISININ		HASIL SINTESIS	
	δ H (ppm)	δ C (ppm)	δ H (ppm)	δ C (ppm)
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	105.49	-	104.31
4	2.04; 2.07 (2H,dd)	35.97	1.82; 1.76 (2H,dd)	36.56
5	2.03; 1.44 (2H,m)	24.93	1.70; 1.47 (2H,m)	24.90
5a	1.39 (1H,m)	50.11	1.24 (1H,m)	51.72
6	1.40 (1H,m)	37.61	1.33 (1H,m)	37.67
7	1.77; 1.00 (2H,m)	33.67	1.64;1.23 (2H,m)	34.89
8	1.78; 1.19 (2H,m)	23.49	1.67;1.28 (2H,m)	30.96
8a	1.76 (1H,m)	45.03	1.49 (1H,m)	44.51
9	3.39 (1H,q)	32.98	2.30 (1H,q)	35.00
10	-	172.24	5.60; 4.75 (s,1H)	96.60
11	-	-	-	-
12	5.86 (1H,s)	93.81	5.29 (s,1H)	87.96
12a	-	77.39	-	81.31
3-Me	1.44 (3H,s)	25.29	1.43 (s, 3H)	26.26
6-Me	0.99 (3H,d)	19.94	0.96 (d, 3H)	20.56
9-Me	1.21 (3H,d)	12.67	0.96 (d, 3H)	13.37
-OH	-	-	-	-

Data ^1H NMR untuk mengetahui posisi atom-atom karbon yang mempunyai proton atau tanpa proton. Disamping itu akan diketahui atom-atom lainnya yang berkaitan dengan proton. Data analisis spektrum ^1H NMR menunjukkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada nilai geseran kimia δ 2.77 ppm (singlet, 1H). Selain itu dari spektrum tersebut menunjukkan adanya gugus proton dari -OH pada C-10 yang terdiri dari 10α dan 10β masing-masing dengan nilai geseran kimia 4,75 ppm (triplet, 1H) dan 5.60 ppm (singlet, 1H) dan nilai ini tidak ditemukan pada senyawa awal atau artemisinin. Hal ini juga yang memperkuat

bahwa adanya perubahan pada C-10 menjadi gugus hidroksil. Signal proton lainnya menunjukkan adanya tiga buah gugus metil yaitu pada pergeseran kimia pada 1.43 ppm (singlet, 3-Me) yakni metil yang tidak memiliki tetangga karbon yang terikat dengan hidrogen dan 0.96 ppm yang berbentuk doublet (d) adalah gugus metil dengan tetangga karbon yang terikat dengan 1 atom hidrogen yang menunjukkan 6-Me dan 9-Me dengan nilai integrasi masing-masing 3H. Signal tersebut menunjukkan adanya gugus metil pada atom C-3, C-6 dan C-9 yang diperkuat dengan data ^{13}C NMR.



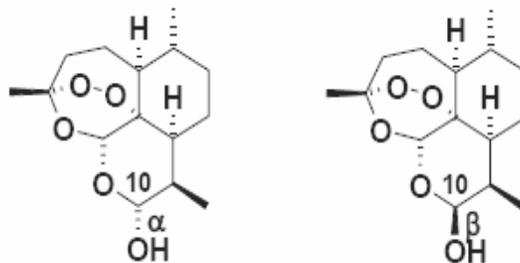
Selain itu, spektrum ^1H NMR menunjukkan adanya gugus metilen pada atom C-4, C-5, C-7, C-8 yang memberikan signal multiplet. Pada atom C-4 terdiri dari 4α dan 4β , dimana pada pergeseran kimia 4α sebesar 1.82 ppm (dd, 1H) dan pergeseran kimia pada 4β sebesar 1.76 ppm (dd, 1H) yang terikat dengan 1 atom hidrogen dan dengan adanya pengaruh gugus metil pada atom C-3 juga akan terjadi koupling sehingga memberikan signal doublet. Pada atom C-5 memberikan signal pada pergeseran kimia 1.70 ppm dan 1.47 ppm (multiplet, 2H) yang merupakan pergeseran kimia dua proton dari gugus $-\text{CH}_2$ yang terikat dengan tetangga karbon yang mengikat 5 atom hidrogen. Pada $\delta = 1.23$ dan 1.64 ppm (multiplet, 2H) adalah pergeseran kimia dua proton dari gugus $-\text{CH}_2$, pada $\delta = 1.67$ dan 1.28 ppm (multiplet, 2H) adalah pergeseran kimia dua proton dari gugus $-\text{CH}_2$.

Pada $\delta = 1.24$ ppm (multiplet, 1H) adalah pergeseran kimia satu proton gugus $-\text{CH}$ dari atom C-5a, $\delta = 1.33$ ppm (multiplet, 1H) adalah pergeseran satu proton gugus $-\text{CH}$ dari atom C-6, $\delta = 1.49$ ppm (multiplet, 1H) adalah pergeseran satu proton gugus $-\text{CH}$ dari atom C-8a, $\delta = 2.30$ ppm (quartet, 1H) adalah pergeseran satu proton gugus $-\text{CH}$ dari atom C-9 yang terikat dengan tetangga karbon yang mengikat 3 atom hidrogen, $\delta = 5.29$ ppm (singlet, 1H) adalah

pergeseran satu proton gugus $-CH$ dari atom C-12 yang tidak memiliki tetangga karbon yang terikat dengan hidrogen yang muncul *downfield* karena berdekatan dengan atom oksigen. Sedangkan C kuartener terdapat pada C-3, C-12a dan C-10.

Berdasarkan penelusuran pustaka diketahui bahwa dihidroartemisinin yang dihasilkan dari sintesis artemisinin biasanya menghasilkan campuran rasemat yang terdiri dalam bentuk α dan β . Hal ini ditunjukkan dengan adanya signal pada 4.78 ppm dalam bentuk triplet (t) dengan integrasi 1H dengan pasangannya pada 5.38 ppm yang berbentuk singlet dengan integrasi 1H adalah dihidroartemisinin dalam bentuk α dan bentuk β yang ditandai dengan adanya sinyal pada 5.60 ppm dalam bentuk singlet (s) dengan integrasi 1H. Pada spektrum ^{13}C NMR juga menunjukkan jumlah karbon yang mewakili lebih dari 15, hal ini dikarenakan pada spektrum tersebut memberikan signal yang sama dengan nilai yang sangat berdekatan dan hampir sama (Medicine for Malaria Venture).

Dihidroartemisinin dalam bentuk campuran epimer disebut juga gugus 10α -hidroksil dan 10β -hidroksil. Konfigurasi epimer hanya berbeda pada atom C-10 yang merupakan pusat epimer dari laktol. Perbandingan antara 10α dan 10β epimer didalam larutan kloroform adalah 1:1, aseton 2:1, dan dimetil sulfoksida 3:1 yang ditentukan melalui penentuan spektroskopi NMR. Dihidroartemisinin dapat dikonversi menjadi artemeter dan artesunat. Artemeter berasal dari β -isomer dan artesunat dari α -isomer. Gugus OH pada β -isomer lebih mempunyai halangan sterik sehingga tidak memungkinkan untuk suksinat anhidrat untuk menyerang gugus tersebut. Sedangkan gugus $-OH$ pada α -isomer berada dalam bentuk equatorial dan kurang berinteraksi dengan gugus tetangga, jadi suksinat anhidrat bisa dengan mudah menyerang. α -isomer mempunyai kestabilan yang sangat tinggi dibandingkan β -isomer (Haynes et al., 2006).



Gambar 4.3 Epimer Dihidroartemisinin

Adanya perubahan harga Rf dan didukung oleh data-data spektroskopi menunjukkan bahwa reaksi sintesis senyawa artemisinin telah berlangsung dan senyawa hasil sintesis ini merupakan dihidroartemisinin dalam bentuk campuran rasemat.

4.3 Uji Aktivitas Antimalaria

Uji aktivitas antimalaria yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengujian secara *in vitro*, dengan menggunakan metode yang diperkenalkan oleh Trager dan Jensen (1976). Dengan uji ini dapat dilihat aktivitas antimalaria suatu senyawa dengan menganalisis penurunan pertumbuhan parasitemia yang diberikan perlakuan dengan senyawa uji. Uji secara *in vitro* ini menggambarkan aktivitas antimalaria terhadap parasit plasmodium pada fase eritrosit, karena parasit ditumbuhkan seolah-olah berada dalam sel darah merah tubuh. Kondisi lingkungan pun di kondisikan menyerupai tubuh, yakni diinkubasi pada inkubator dengan aliran gas karbon dioksida dan suhu 37°C (Trager dan Jensen, 1976).

Tabel 4.5 Data uji aktivitas antimalaria isolat terhadap pertumbuhan *P. falciparum*

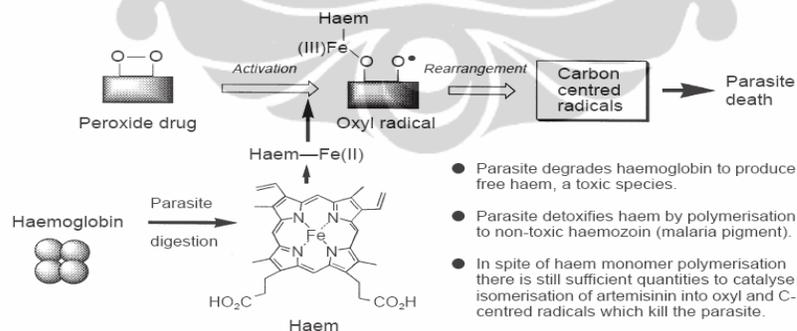
Sampel	Parasitemia (%)	Parasitemia (%)	Rata2 (%)	Parasitemia (%)	Parasitemia (%)	Rata2 (%)	Pertumbuhan (%)	Dose dependent (M)
DHA								IC ₅₀ 2x10 ⁻⁷
Kontrol	0.5	0.8	0.65	0.9	1.2	1.05	100.00%	
10 ⁻⁹	0.4	0.7	0.55	0.9	0.9	0.9	85.71%	
10 ⁻⁸	0.3	0.4	0.35	0.8	0.9	0.85	80.95%	
10 ⁻⁷	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	38.10%	
10 ⁻⁶	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	28.57%	
10 ⁻⁵	0.2	0.3	0.25	0.2	0.2	0.2	19.05%	
Klorokuin								Dose dependent
kontrol	0,45	0,5	0,475	3,7	4	3,85	100	IC ₅₀ 3x10 ⁻⁹
10 ⁻⁹	0,45	0,5	0,475	2,3	2,8	2,55	66,23	
10 ⁻⁸	0,45	0,5	0,475	0,3	0,8	0,55	14,29	
10 ⁻⁷	0,45	0,5	0,475	0,08	0,09	0,085	2,21	
10 ⁻⁶	0,45	0,5	0,475	0,03	0,03	0,035	0,91	
10 ⁻⁵	0,45	0,5	0,475	0,01	0,01	0,005	0,13	

Pada uji aktivitas antimalaria, konsentrasi klorokuin yang digunakan adalah konsentrasi hasil penelitian WHO pada beberapa obat antimalaria dan pada konsentrasi ini klorokuin menghambat secara sempurna pertumbuhan dari parasit.

Sampai saat ini klorokuin masih digunakan sebagai obat untuk menangani serangan malaria (Purwantiningsih, 2003).

Hasil sintesis di uji aktivitas antimalaria secara *in vitro*. Sampel diuji dengan lima variasi konsentrasi yakni 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} mg/mL, dimana sampel dilakukan pengujian dengan dua kali pengulangan. Kontrol adalah parasit yang tidak diberikan senyawa uji. Hambatan pertumbuhan dihitung berdasarkan hasil perbandingan dengan pertumbuhan pada kelompok kontrol tanpa obat. Efek hambatan pertumbuhan merupakan nilai rata-rata dari eksperimen dilakukan secara duplo.

Kebanyakan bahan kimia eksogen yang bukan merupakan bagian dari sistem biologis makhluk hidup potensial menjadi racun bagi makhluk hidup yang bersangkutan. Obat malaria bekerja terhadap merozoit pada fase eritrositik aseksual dari parasit malaria dan menghambat skizogoni eritrositik (Purwantiningsih, 2003). Uji Antimalaria secara *in vitro* terhadap senyawa dihidroartemisinin dalam bentuk rasemat ini yang disintesis dari artemisinin memperlihatkan aktivitas antimalaria dengan nilai $IC_{50} 2 \times 10^{-7}$ M. Aktivitas antimalaria dari dihidroartemisinin ini sangat berpengaruh dengan posisi ikatan peroksida pada strukturnya. Senyawa ini memiliki jembatan peroksida (-C-O-O-C-) yang memberikan aktivitas antimalaria yang potensial.



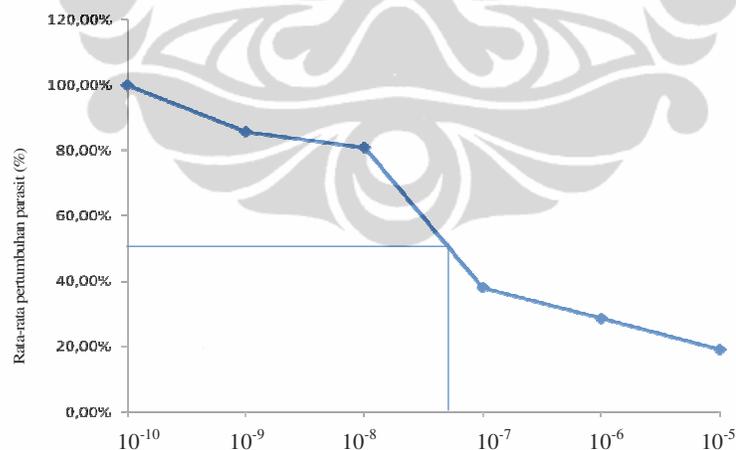
Gambar 4.4 Skema mekanisme aksi dari peroksida antimalaria

Aktivitas antimalaria dari senyawa ini disebabkan oleh kemampuan peroksida membentuk kompleks dengan heme dan penghambatan pembentukan hemozoin (Gambar 4.4). Heme adalah hasil penguraian hemoglobin oleh parasit, yang merupakan senyawa radikal yang bersifat toksik terhadap parasit

plasmodium. Oleh karena itu heme tersebut akan dirubah oleh parasit menjadi bentuk yang tidak toksik yakni hemozoin. Belum ada penjelasan mekanisme senyawa ini senyawa jelas, tetapi dari telaahan beberapa pustaka menyebutkan bahwa terbentuknya radikal bebas dihidroartemisinin dipacu oleh ion besi II yang terikat kovalen dalam molekul hemoglobin (Klayman, 1985).

Mekanisme aksi artemisinin/derivatnya dan endoperoksida antimalaria (Pandey, 1999):

1. Pembentukan kompleks dengan heme, dimana didalam heme tersebut, senyawa Artemisinin dan turunannya diaktivasi oleh ion besi II untuk menghasilkan radikal bebas atau spesies intermediet elektrofilik.
2. Spesies radikal bebas tersebut bereaksi dan merusak protein malaria yang berasosiasi dengan membran. Atau,
3. Endoperoksida menghambat pembentukan hemozoin sehingga hemozoin rusak/terganggu dan persediaan heme bebas menjadi sedikit dan terjadi pembentukan radikal bebas sehingga terjadi kerusakan membran, terbentuk alkilasi dari parasit malaria, hemolisis dan parasit mati.



Gambar 4.5 Grafik penghambatan pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* terhadap berbagai konsentrasi senyawa dihidroartemisinin

Dari data diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa senyawa hasil sintesis ini memperlihatkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan parasit *P.*

falciparum cukup bermakna, juga penurunan parasitemia berhubungan dengan konsentrasi senyawa (*dose dependent*). Oleh karena itu dapat dibuat grafik penghambatan pertumbuhan parasit terhadap dosis yang diberikan (gambar 4.5). Peningkatan konsentrasi senyawa uji memperlihatkan penurunan jumlah parasitemia. Penghambatan pertumbuhan parasit yang berhubungan dengan dosis juga diperlihatkan oleh senyawa kontrol positif yaitu klorokuin. Penurunan parasitemia sangat tajam karena klorokuin memiliki aktivitas yang sangat kuat sebagai antimalaria, yakni dengan IC_{50} sebesar 3×10^{-9} M.

Artemisinin secara kimia kurang stabil dan mempunyai kelarutan dalam air dan minyak yang sangat rendah, gugus karbonil pada C-10 merupakan senyawa induk untuk di reduksi menjadi dihidroartemisinin. Secara klinik turunan artemisinin lebih poten, mempunyai aksi yang sangat cepat dan ditoleransi dengan baik oleh skizontocid darah, menghasilkan waktu *clearance* parasit yang sangat pendek dibandingkan obat antimalaria lainnya. Artemisinin mempunyai keefektifan yang sangat tinggi pada *Plasmodium falciparum* yang telah resisten terhadap obat antimalaria lainnya. Untuk mengatasi kecepatan *recrudescence* tidak digunakan dalam bentuk monoterapi. Penelitian secara *in vitro* pada laboratorium menggunakan *P.falciparum* menunjukkan bahwa dihidroartemisinin lebih aktif dibandingkan derivatif artemisinin lainnya dengan IC_{50} 0,25-4,56 nM untuk strain 3D7 dibandingkan artemisinin itu sendiri yang memiliki IC_{50} 49,4 nM untuk strain yang sama (Ringwald et al., 1999).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan diperoleh kesimpulan dan saran sebagai berikut:

5.1 Kesimpulan

1. Katalis Ni/TiO₂ dapat digunakan untuk mensintesis artemisinin menjadi dihidroartemisinin melalui proses hidrogenasi menggunakan katalis Ni/TiO₂ dalam bentuk campuran rasemat α dan β dengan rendemen sebesar 16,58%.
2. Hasil pengujian aktivitas antimalaria dari senyawa yang dihasilkan menunjukkan bahwa senyawa tersebut aktif pada kultur parasit *P. falciparum* klon 3D7 *in vitro* dengan IC₅₀= 0,2 nM.

5.2 Saran

Dengan diperolehnya hasil sintesis ini menunjukkan bahwa penggunaan katalis logam Ni/TiO₂ dapat mereduksi artemisinin meskipun dengan rendemen yang sangat rendah. Pada penelitian ini, karena keterbatasan bahan dan waktu, maka belum dilakukan optimasi proses. Oleh karena itu, pada penelitian berikutnya disarankan perlu adanya optimasi proses yang meliputi pelarut, waktu reaksi, suhu reaksi, lama waktu dan kecepatan pengadukan serta konsentrasi katalis yang sesuai agar diperoleh rendemen yang lebih tinggi. Untuk melihat keberadaan gugus peroksida dari senyawa yang dihasilkan dapat menggunakan alat voltmeter.

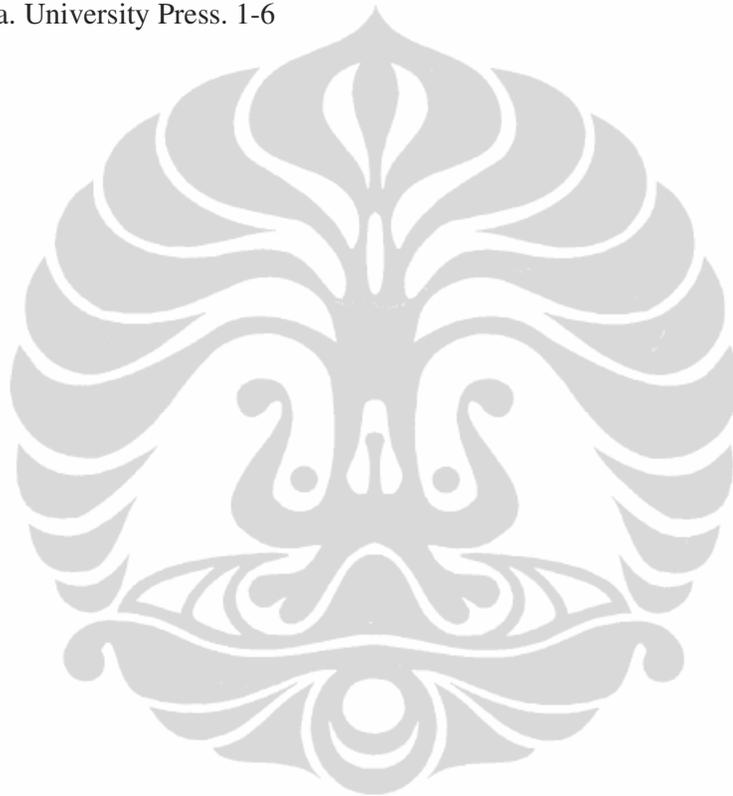
DAFTAR PUSTAKA

1. Acton., et al. (1993). Synthesis and antimalarial activity of some 9-substituted artemisinin derivatives. *J. Med. Chem.* 36: 2552-2557
2. Atkins, PW. (1997). *Kimia Fisik Jilid dua*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
3. Blasko, G and Cordell, G. A. (1988). Definitive ¹H- and ¹³C-NMR assignments of artemisinin (qinghaosu). *Journal of Natural Products*. Vol 51. 6. pp 1273-1276.
4. [CCRG] on Qinghaosu and its derivatives as antimalarials. (1982). The chemistry and synthesis of qinghaosu derivatives, *J. of Traditional Chinese Medicine* Vol. 2 (1): 9-16
5. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). Malaria: Tes resistensi untuk *Plasmodium falciparum*. Jakarta. Dirjen P2M dan PLP. 3-29.
6. El-Ferally., et al. (1990). Conversion of artemisinin to artemisiten. *J. of Natural Products*. 53 (1):66-71
7. El Sohly., et al. (1990). A large scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *J. of Natural Products*. 53(6) : 1560-1564
8. Fessenden dan Fessenden. (1994). *Kimia Organik*. Alih Bahasa oleh Hadyana Pudjaatmaka. Surabaya: Erlangga.
9. Frederic., et al. (2008). Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate. *Journal Pharmacology*, Vol 105, 45, 17579 – 17584.
10. Geldre., et al. (1997). State of art of the production of Antimalarial compound artemisinin in plants. *Planta Molecular Biology*. 33: 199-209
11. Harmita. (2006). *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
12. Haynes., et al. (2006). Artemisone- a new, highly active antimalarial drug of the artemisinin class. Wiley-VCH. 20-23.
13. Jenie, S. A. (2009). Sintesa nano material katalis super asam untuk sistem satu-reaktor (*One Pot System*) siklisasi dan hidrogenasi. Laporan penelitian LIPI – Serpong.
14. Klayman, DL., (1985). Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug

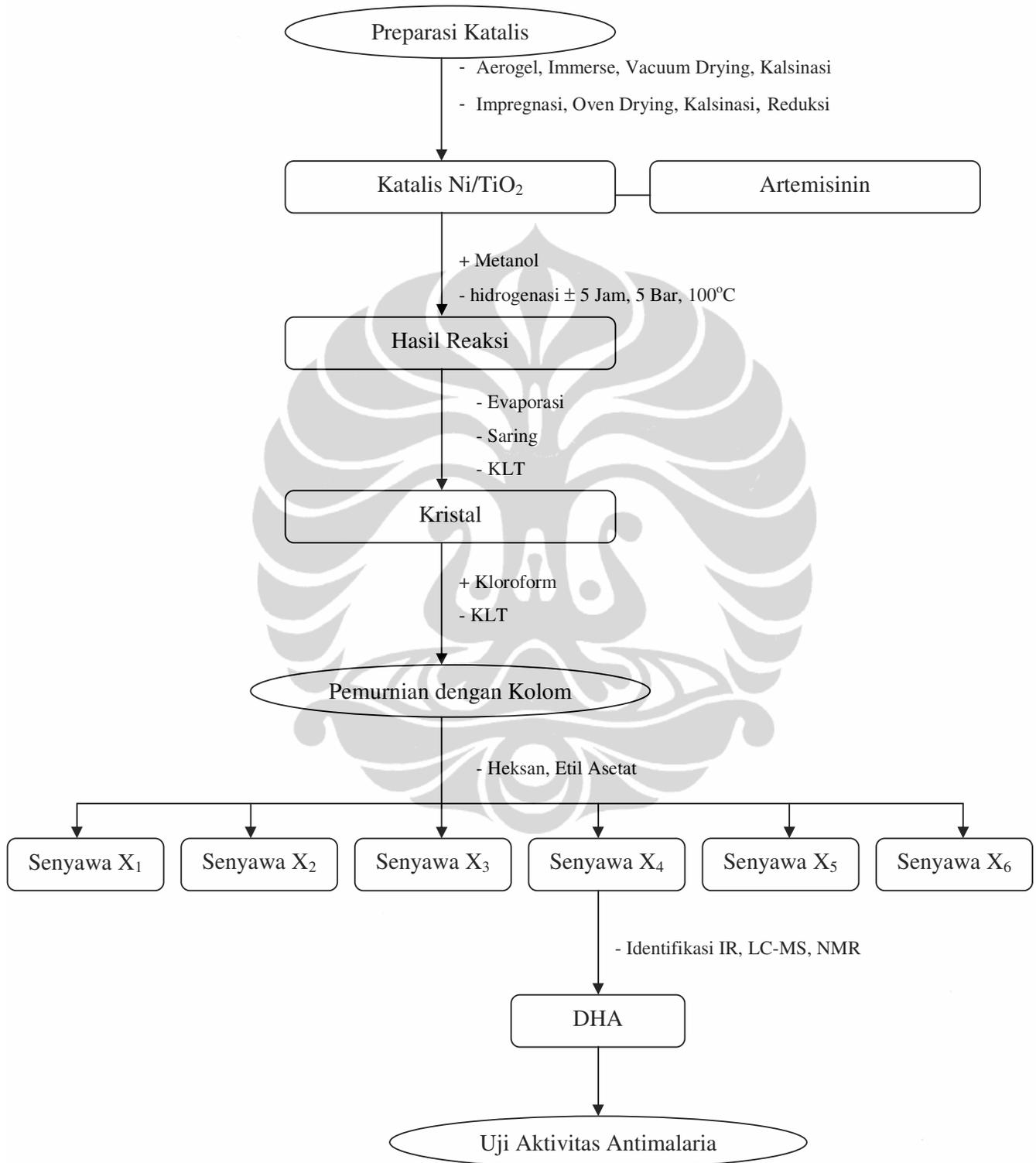
- from China. *Science Direct*. 228: 1094-1054
15. Klayman, D.L., et al., (1984). Isolation of artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. of Natural Products*. 47 (4): 715-717
 16. Laksono, A. J. (2008). Sintesa Nano Material Katalis Super Asam untuk Sistem Satu-Reaktor (*One Pot System*) Siklisasi dan Hidrogenasi. Laporan penelitian LIPI – Serpong.
 17. Li. Y., et al. (2006). Qinghaosu (Artemisinin)-A Fantastic Antimalarial Drug from a Traditional Chinese Medicine. Wiley-interscience. 183-256
 18. Lin., et al. (1995). Antimalarial activity of new dihydroartemisinin derivatives. 6. α -alkylbenzyl ethers. *Journal Medicinal Chemistry*. 38. 764-770
 19. Lin., et al. (1987). Antimalarial activity of new water soluble dihydroartemisinin derivatives. *J. Med. Chem.* 30: 2147-2150
 20. Medicine for Malaria Venture. Determining viable protocols for the derivatisation of artemisinin into dihydroartemisinin and into artesunate.
 21. Meshnick, S.R. (1994). The mode of action of antimalarial endoperoxides. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Vol. 88 Suppl 1: S31-32
 22. Nogrady, T. (1985). *Medicine Chemistry*. Biochemistry Approach. New York: Oxford University Press. 376
 23. Nugroho, A dan Wagey, M.T. (2000). Siklus hidup Plasmodium malaria. Dalam: Harijanto, P.N. (editor) *Malaria, epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis dan pelayanan*. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 30-53
 24. Pandey, A. V., et al. (1999). Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification system in malarial parasite. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274. 27. pp 19383-19388
 25. Pine, S.H., et al. (1988). *Kimia Organik I*. Alih Bahasa oleh Ibnu Hajar, ITB Bandung. 286 – 287.
 26. Pinna, F. (1998). Supported Metal Catalyst Preparation. *Catalyst Today*. 41, 129 – 137

27. P. N. Harijanto. Perubahan Radikal dalam Pengobatan Malaria di Indonesia.
28. Purwantiningsih. (2003). *Artemisinin dari Artemisia saccharum, Ledep dan Turunannya Sebagai Komponen Bioaktif Antimalaria*. Bogor : Karya Utama Doktor Kimia, FMIPA Kimia IPB
29. [QACRG]. (1979). Antimalaria studies on qinghaosu. *J. of Medicinal Chemistry*. 92 (12): 811-816
30. Ramachandran, R. (2002). Resistance to antimalarial drugs. India National Magazine from the Publishers at the Hindi. Frontline. 19: 1-8
31. Ringwald., et al. (1999). *In vitro* activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (2). Pp 187-192
32. Sardjoko. (1993). Rancangan Obat. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 30-31
33. Simanjuntak, C.H dan Arbani, P.R. (2009). Status malaria di Indonesia. *Cermin dunia kedokteran*. 55, 3-11.
34. Siswandono dan Soekardjo. (1995). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press. 131-132, 237-238, 247-265.
35. Tang, W and Eisenbrand. (1992). Chinese drug of plant origin: Chemistry pharmacology and use in traditional and modern medicine: *Artemisia annua*. Springer-Verlag. 159-171
36. Tjitra, E. (2000). *Obat Malaria dalam Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*. 195-197, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
37. Trager, W and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193. 673 – 676. The Merck Index. (2001). An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 13th ed. Merck & Co., Inc. Rahway, New York.
38. Usman. (2001). Pengaruh penyangga $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, TiO_2 dan $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$ terhadap aktivitas katalis nikel pada reaksi metanasi CO_2 . Depok: Karya Utama Magister Kimia, FMIPA Kimia UI
39. Vishwakarma, RA. (1990). Stereoselective synthesis of α -artheeter from

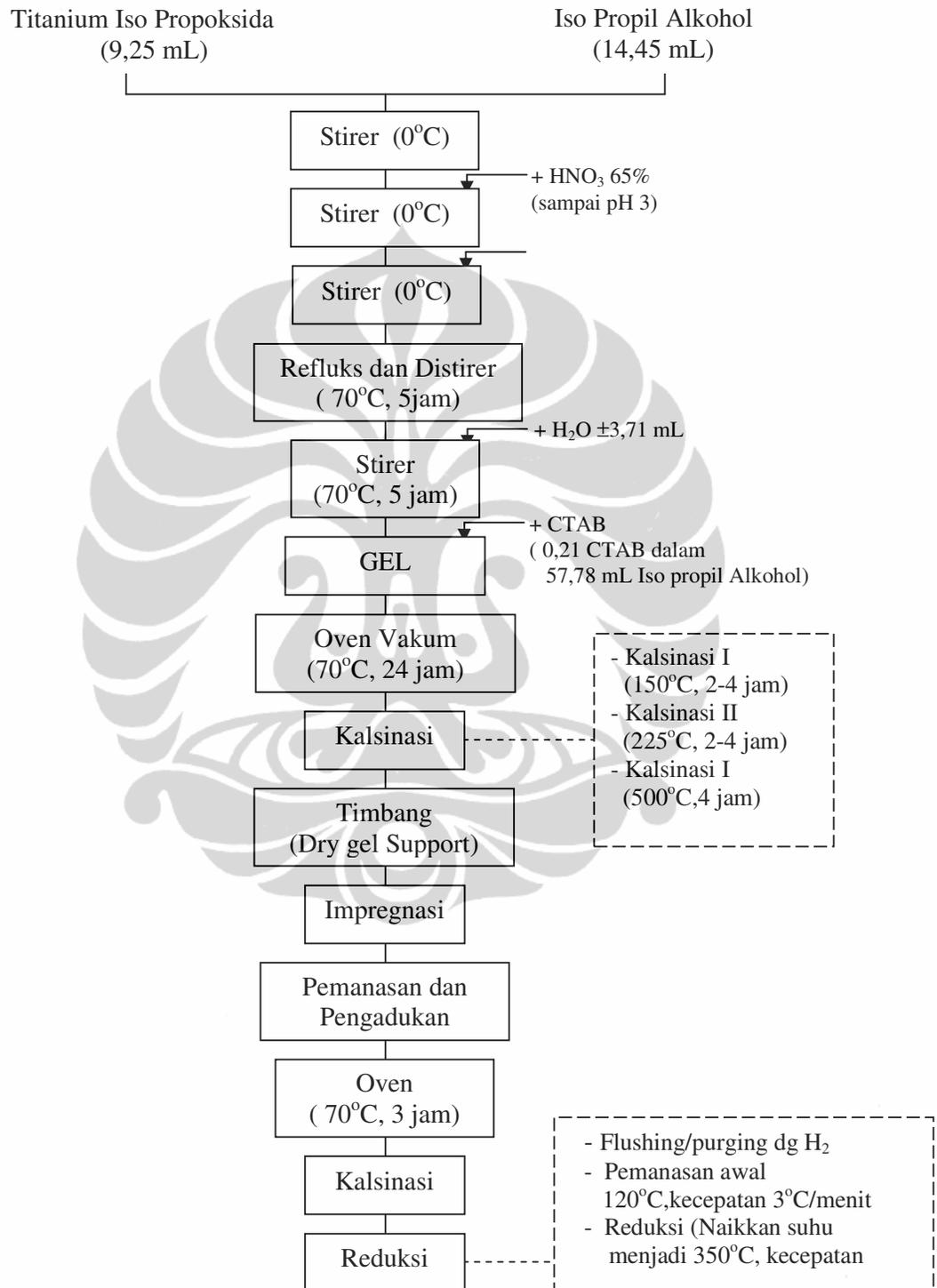
- artemisinin. *J. Natural Products*. 53(1):216-217
40. Wang., et al. (2005). Analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. by LC-MS with selected ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7010-7013
41. WHO. (2005). World Malaria Report. WHO Library Cataloging-in-Publication Data.
42. Wattimena, J. R., et al. (1991). *Farmakodinami dan Terapi Antibiotika*. Yogyakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Gadjah Mada. University Press. 1-6



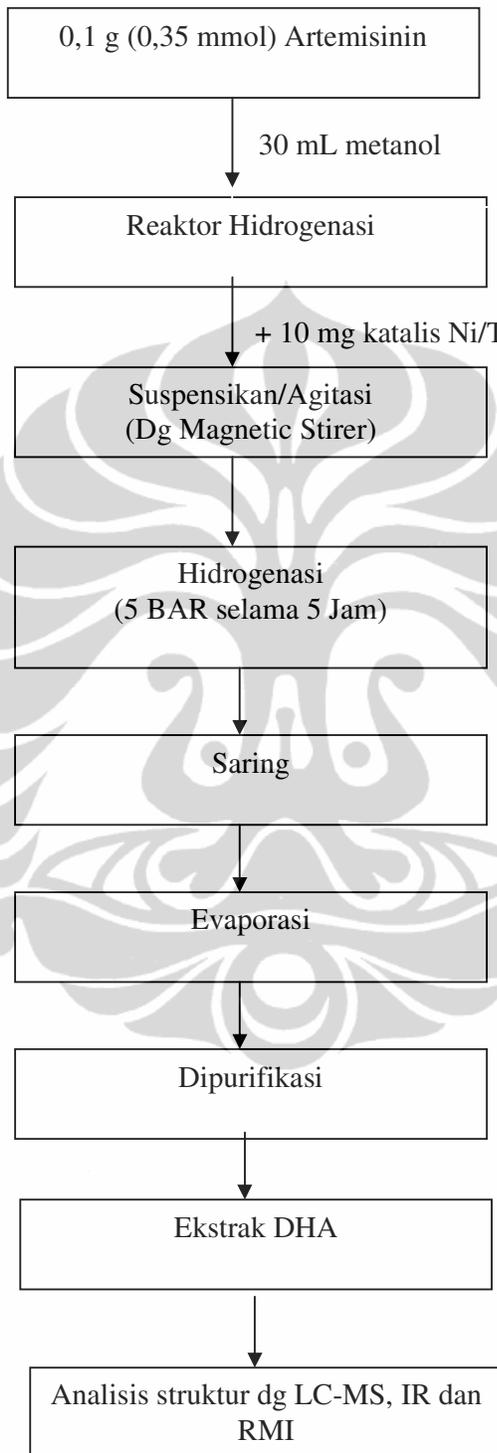
Lampiran 1 Alur Penelitian



Lampiran 2 Prosedur Preparasi Katalis



Lampiran 3 Prosedur Sintesis Dihidroartemisinin



Lampiran 4 Gambar

Gambar 4.1 Preparasi katalis



a. Gambar rangkaian alat preparasi katalis



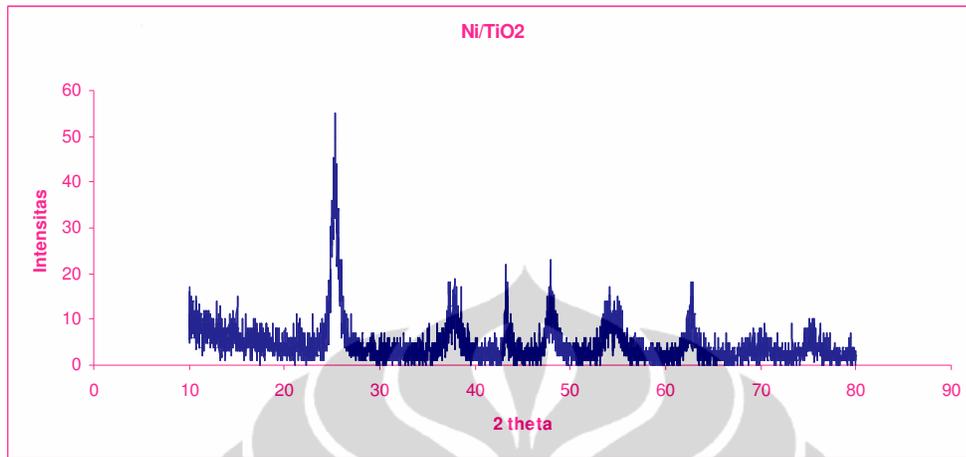
b. Gambar rangkaian alat reduksi katalis

Gambar 4.2 Reaktor Hidrogenasi

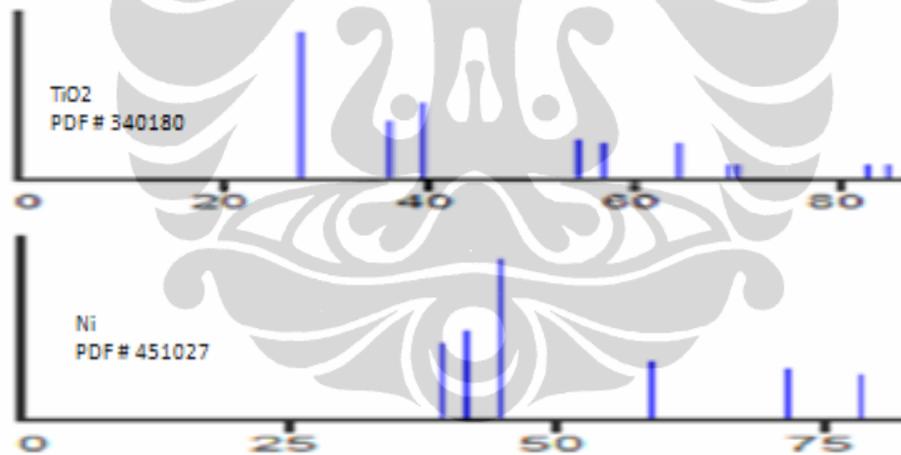


Rangkaian alat hidrogenasi

Gambar 4.3 Kromatogram XRD katalis Ni/TiO₂

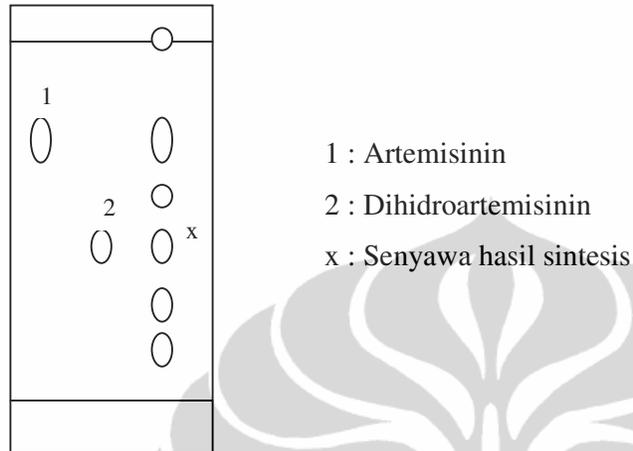


Data base komputer untuk TiO₂ dan Ni

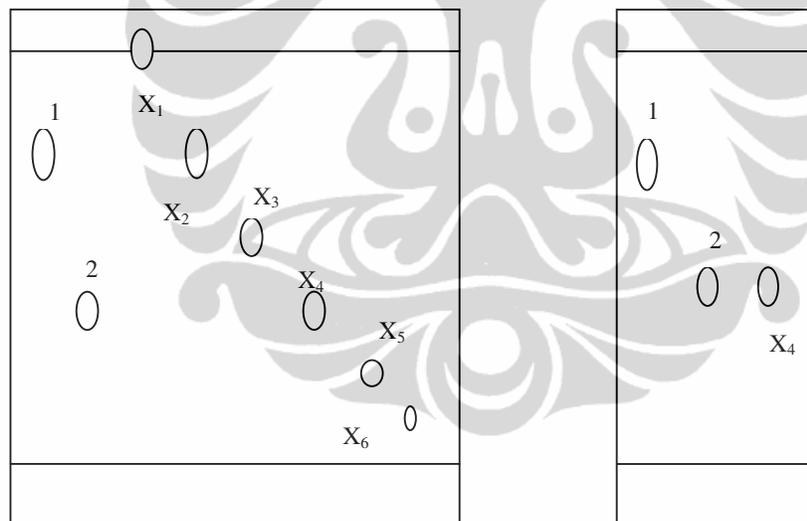


Gambar 4.4 Noda kromatografi lapis tipis

a. Sebelum pemurnian dengan kromatografi kolom



b. Setelah pemurnian dengan kromatografi kolom



Ket : Noda KLT satu dimensi dengan eluen toluen : etil asetat : asam formiat
(7:3:1)

1 = Artemisinin

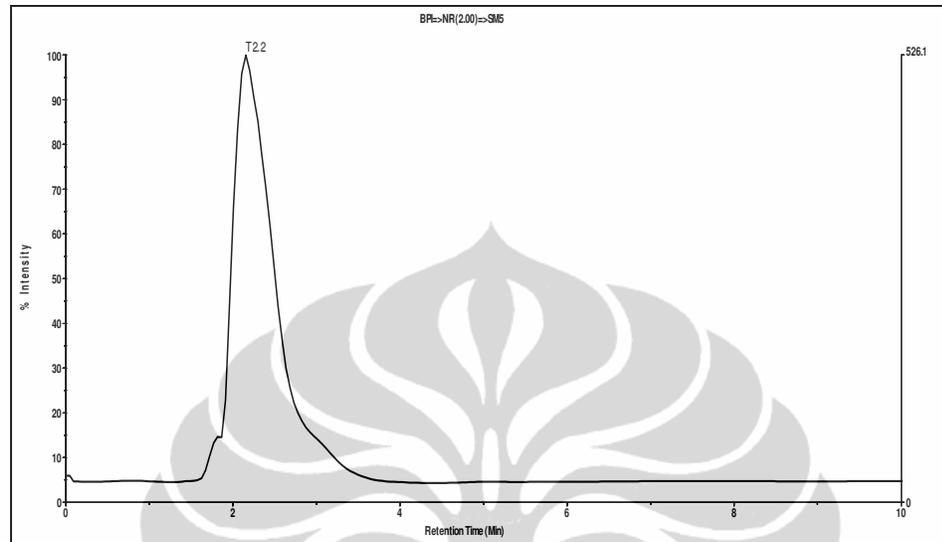
2 = Dihydroartemisinin

X₁ - X₆ = senyawa hasil pemurnian kolom

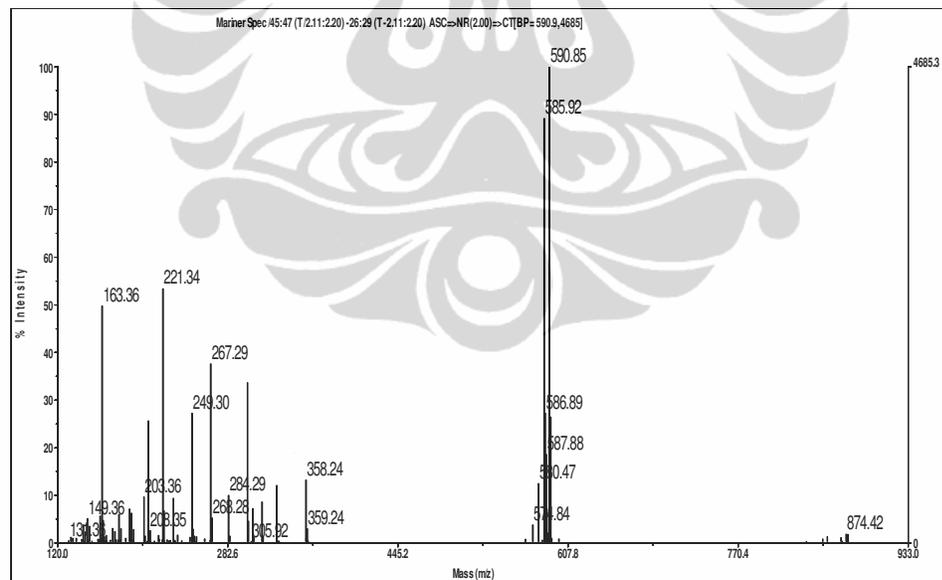
X₄ = Senyawa target

Gambar 4.5 Pola kromatogram dan spektrum massa senyawa hasil reaksi

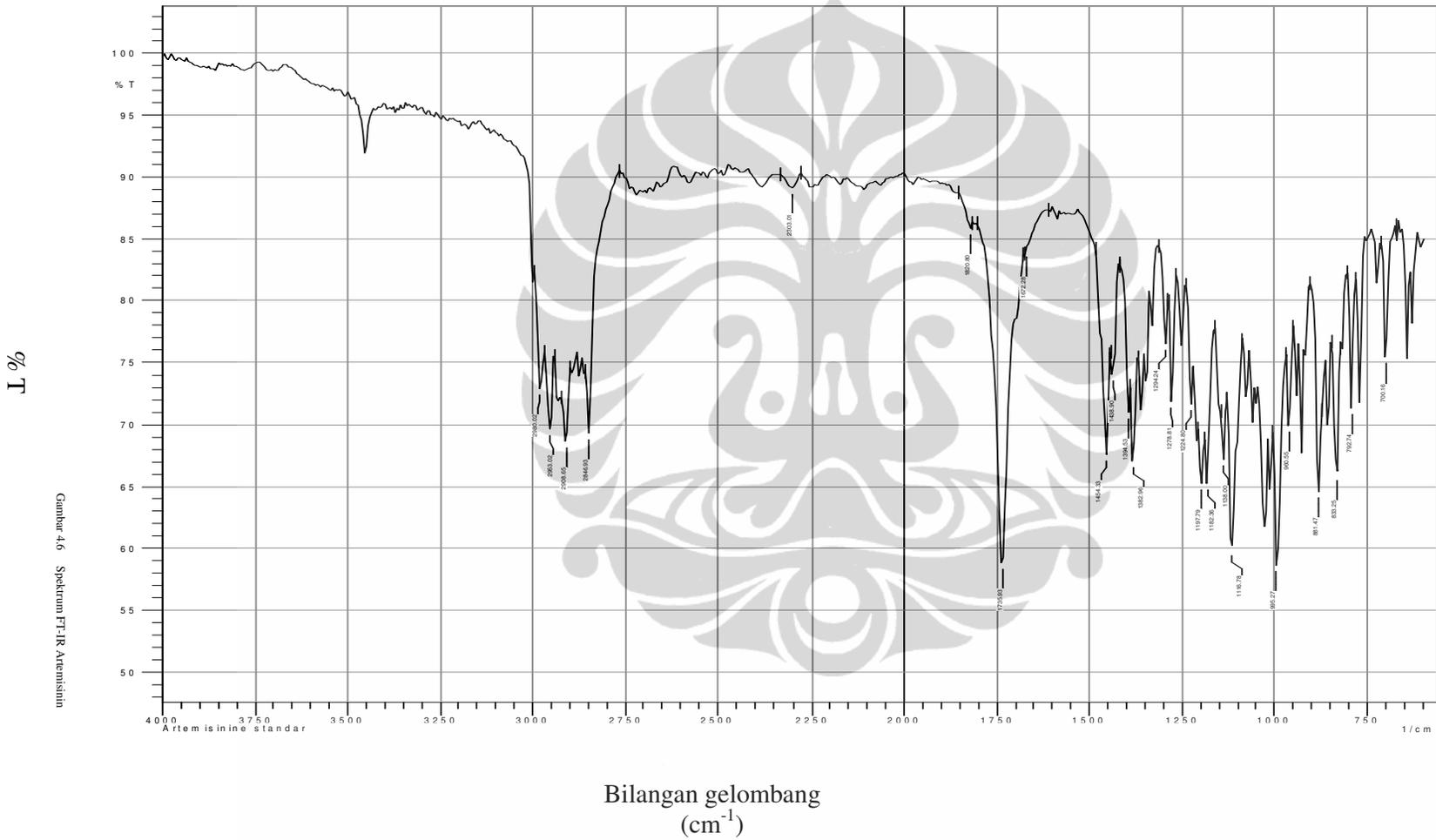
a. Pola kromatogram



b. Spektrum massa

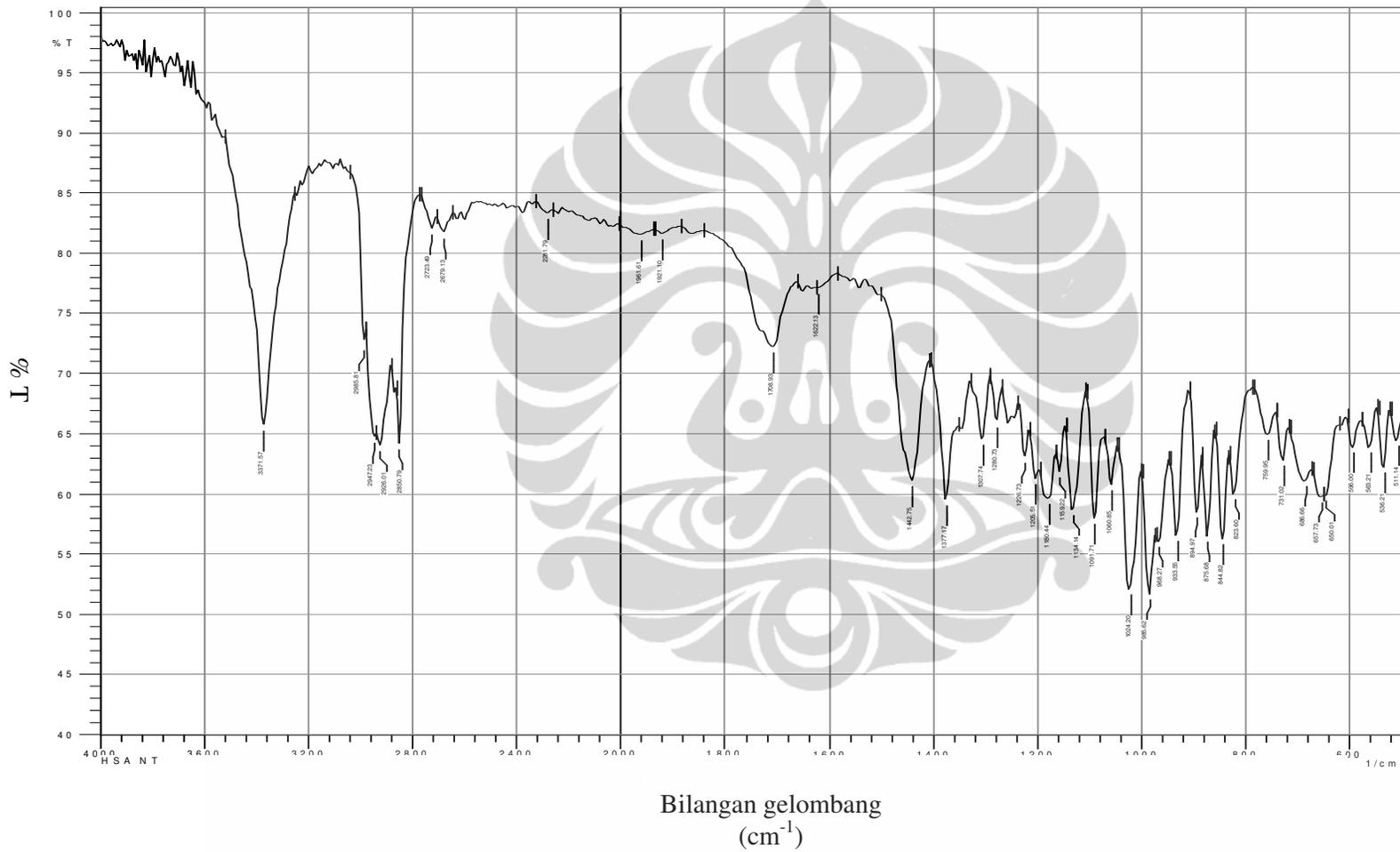


Gambar 4.6 Spektum FT-IR Artemisinin



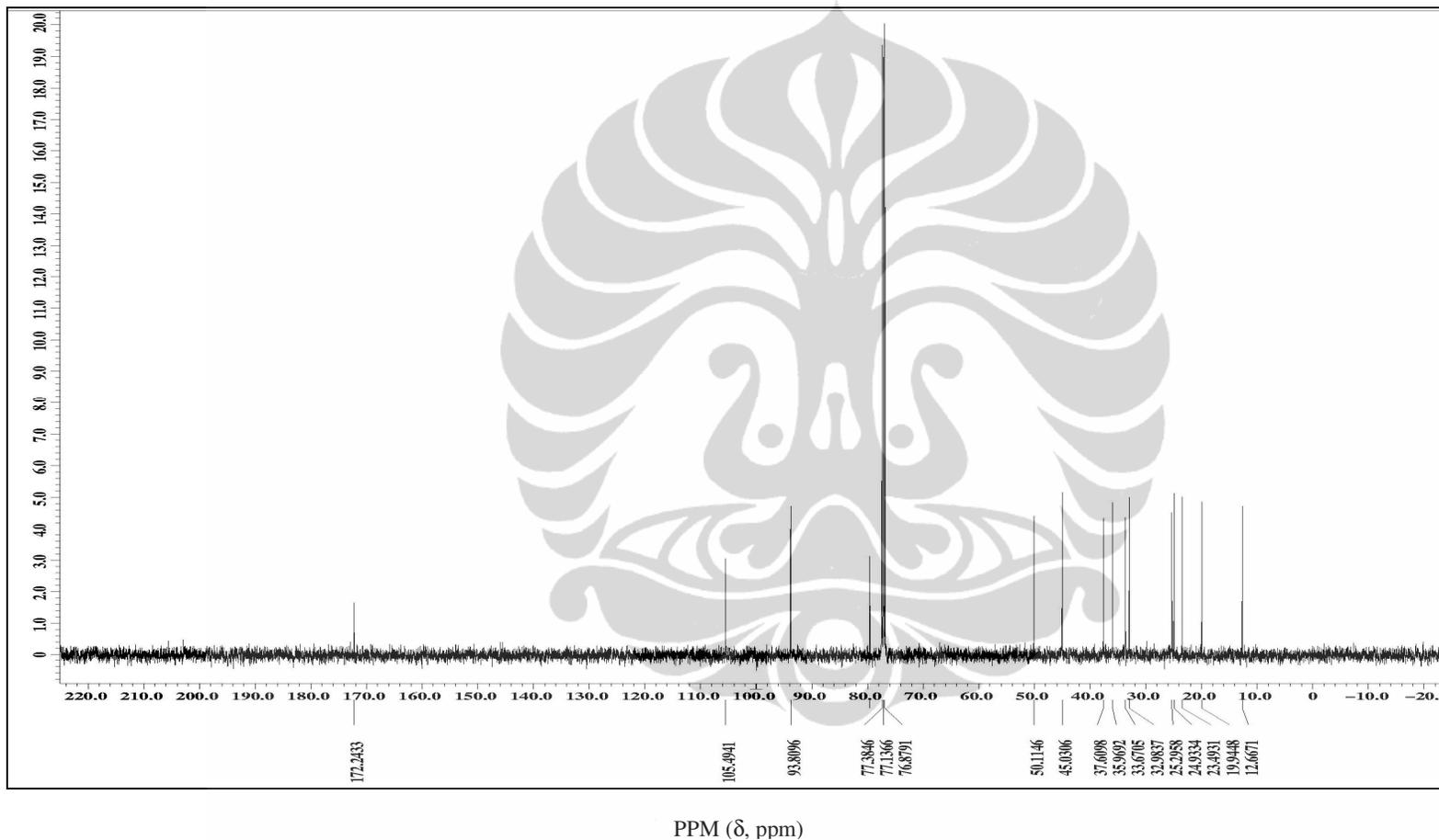
% T

Gambar 4.6 Spektum FT-IR Artemisinin

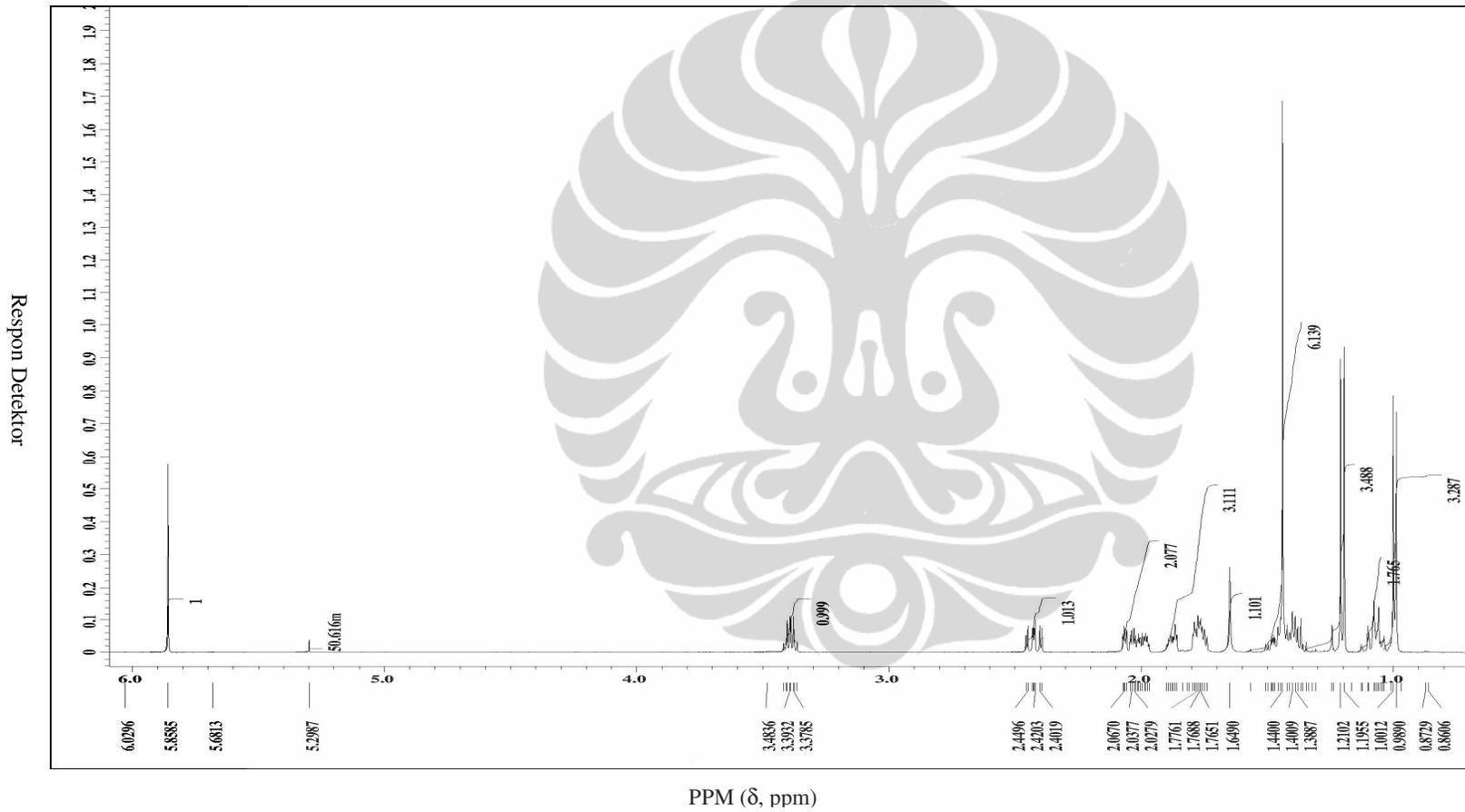


Gambar 4.7 Spektum FT-IR Senyawa Hasil Reaksi

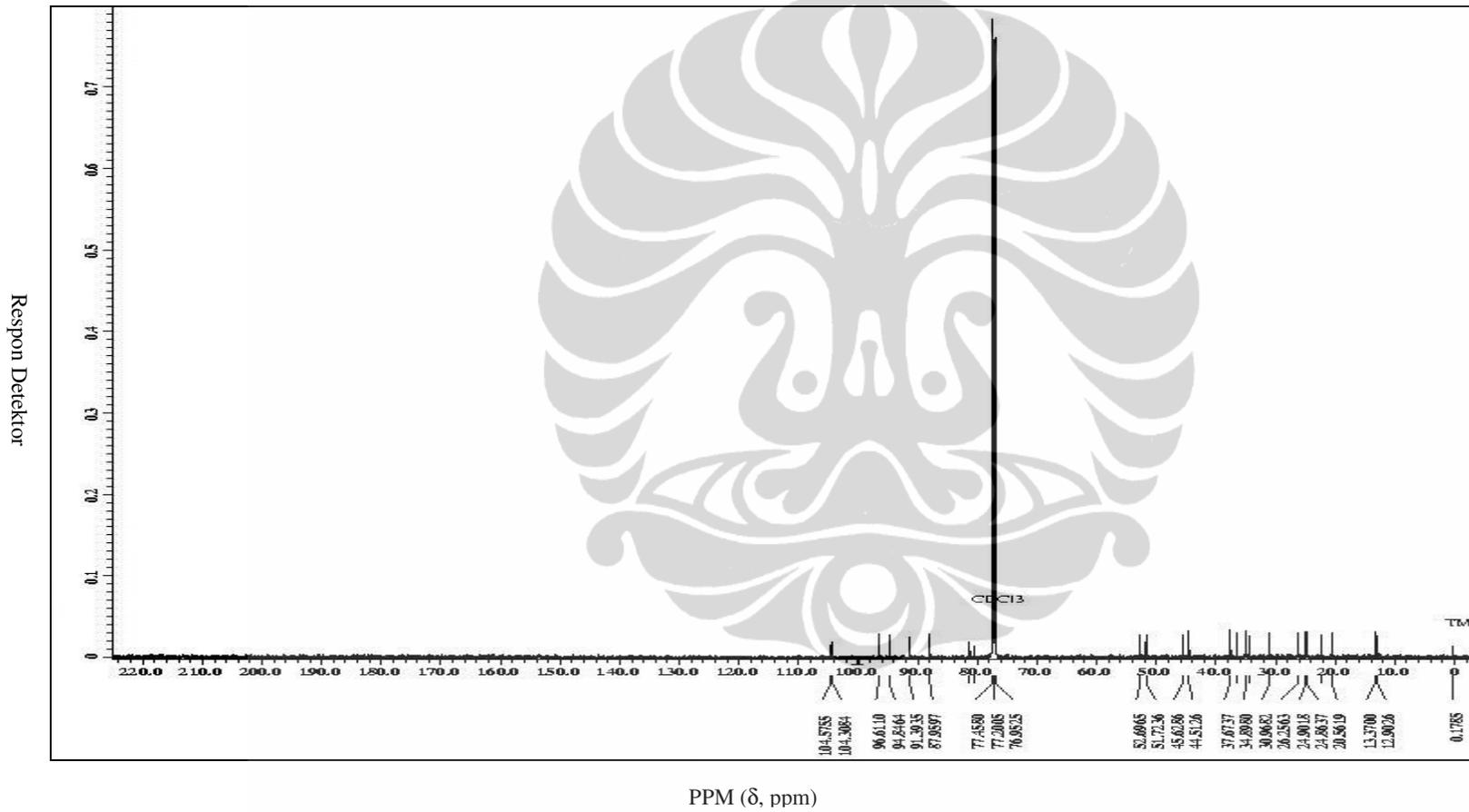
Respon Detektor



Gambar 4.8 Spektrum ^{13}C NMR Artemisinin

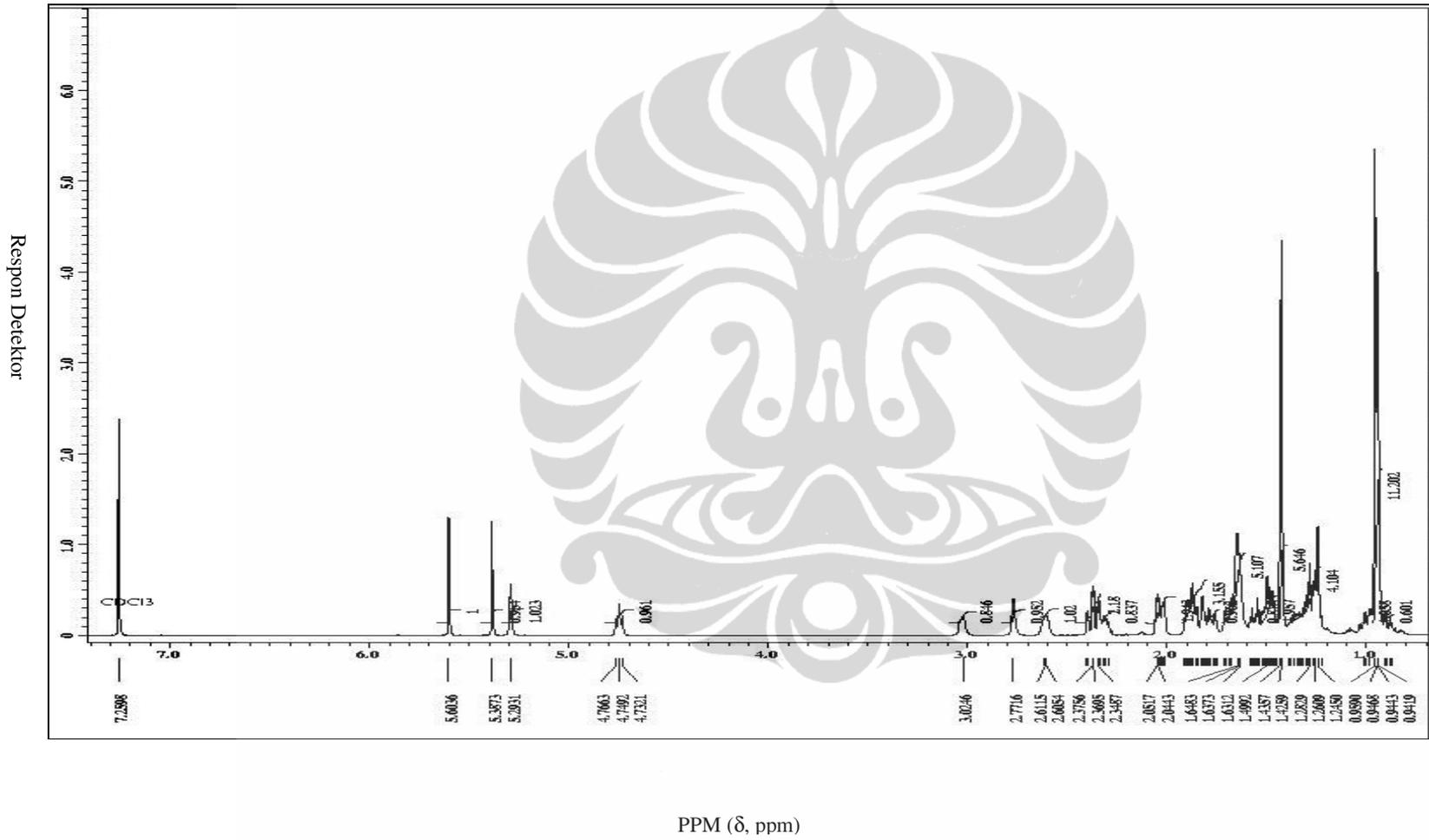


Gambar 4.9.1 Spektrum ^1H NMR Artemisinin

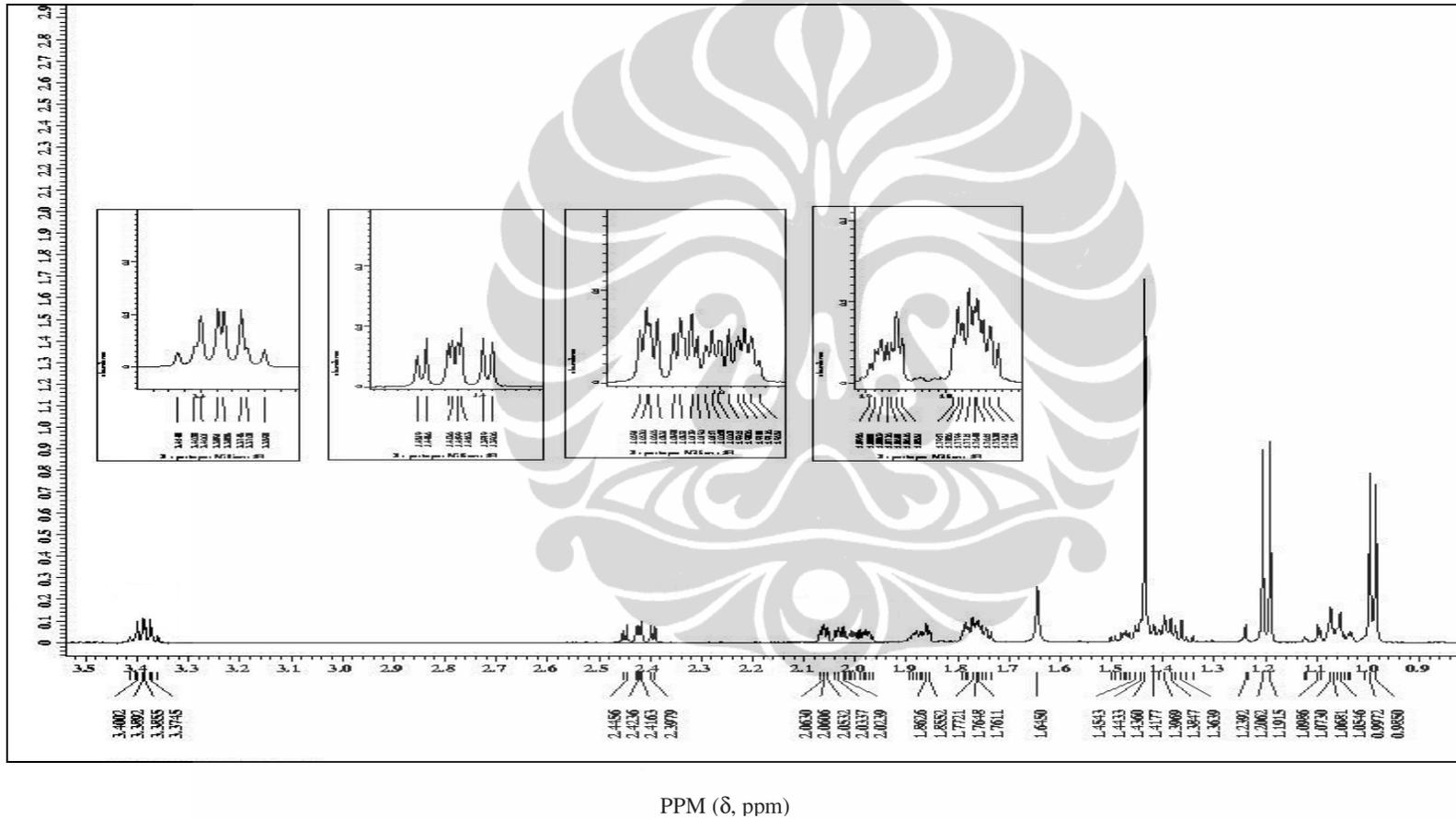


Gambar 4.9.3 Spektrum ^{13}C NMR Senyawa Target

Gambar 4.9.4 Spektum ¹H NMR Senyawa Target



Gambar 4.9.2 Spektrum Perbesaran ¹H NMR Artemisinin



Respon Detektor

Gambar 4.9.5 Spektum Perbesaran ¹H NMR Senyawa target

