

**UJI EFEKTIVITAS DAN TOKSISITAS ANTIMALARIA FRAKSI NOMOR 33K,
35K DAN 36K METABOLIT SEKUNDER *Streptomyces hygrosopicus*
subsp. Hygrosopicus SECARA *IN VITRO***

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan memperoleh Gelar Magister



Oleh:

**ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH
206070117111012**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KONSENTRASI PARASITOLOGI DAN MIKROBIOLOGI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2023**



**UJI EFEKTIVITAS DAN TOKSISITAS ANTIMALARIA FRAKSI NOMOR 33K,
35K DAN 36K METABOLIT SEKUNDER *Streptomyces hygroscopicus*
subsp. *Hygroscopicus* SECARA *IN VITRO***

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan memperoleh Gelar Magister



Oleh:

ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH

206070117111012

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KONSENTRASI ANATOMI DAN HISTOLOGI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2023

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak dapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 09 Januari 2023

Mahasiswa,



Nama : Alif Raudhah Husnul K.

NIM : 206070117111012

PS : Ilmu Biomedik

Prog. : Pascasarjana

Fak : Kedokteran UB

**IDENTITAS KOMITE PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS**

Judul Tesis :

Uji Efektivitas dan Toksisitas Antimalaria Fraksi Nomor 33K, 35K dan 36K Metabolit Sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* Secara *In Vitro*

Nama : Alif Raudhah Husnul Khotimah

NIM : 206070117111012

Program Studi: Ilmu Biomedik

Bidang Minat : Anatomi dan Histologi

Komite Pembimbing

Ketua : Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes, Sp.Park.

Anggota : Prof. Agustina Tri Endharti S,Si, PhD

Komite Penguji

Penguji 1 : Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono., DTM&H, MSc, SpPark

Penguji 2 : Prof. Dr. Roihatul Mutiah, M.Kes.,Apt

Tanggal Ujian : 9 Januari 2023

SK Penguji : ~~-----~~

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warahmatullahi wa barakatuh.

Puji syukur alhamdulillah kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul **Uji Efektivitas dan Toksisitas Antimalaria Fraksi Nomor 33K, 35K dan 36K Metabolit Sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* Secara *In Vitro***

Potensi fraksi nomor 33K, 35K dan 36K metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* dalam proposal tesis ini masih belum pernah diteliti aktivitas anti malarianya. Sehingga perlu adanya penelitian untuk lebih mendalami potensi fraksi metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* ini guna kandidat terapi infeksi parasit malaria.

Selanjutnya penulis mengucapkan terima kasih kepada Allah SWT dan semua pihak atas doa, harapan dan semangat yang telah diberikan sehingga penulis mampu melewati kesulitan dan hambatan dalam penyusunan tesis ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., SpA(K), selaku ketua Dekan Fakultas Kedokteran Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes, Sp.ParK. dan Prof. Agustina Tri Endharti S,Si, PhD selaku dosen pembimbing yang telah senantiasa membimbing, memberikan ilmu dan masukan berharga bagi penulis sehingga dapat menyusun proposal tesis ini dengan baik.
3. Ayahanda, Ibunda dan keluarga tercinta yang senantiasa memberikan doa restu, nasihat dan dukungan kepada penulis dalam menuntut ilmu dan menempuh studi ini dengan baik.
4. Badrus Umam Syabana yang telah setia menemani, memberi dukungan dan semangat kepada penulis selama proses penulisan tesis ini.
5. Hafshah Yasmina Abidah, Fadilah Istiapalja, Mahya Nailul 'Azizah, Mutiara Nor Afifah dan Maulidya Machdaniar sebagai teman seperjuangan selama melakukan penelitian dan penyusunan tesis ini.
6. Segenap civitas akademika Program Studi Magister Ilmu Biomedik, terutama seluruh dosen dan laboran, terima kasih atas segenap ilmu, bantuan dan bimbingannya.



7. Teman-teman neonatus angkatan 2016 yang senantiasa membantu, memberi dukungan dan semangat selama proses pengerjaan tesis ini.
8. Semua pihak yang turut serta dalam membantu dan memberi semangat penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih terdapat banyak kekurangan. Akan tetapi, penulis berharap proposal tesis ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca dan khususnya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamualaikum warrahmatullahi wabaraktuh.

Malang, Januari 2023

Penulis

RINGKASAN

Alif Raudhah Husnul Khotimah, NIM. 206070117111012. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 9 Januari 2023. Uji Efektivitas dan Toksisitas Antimalaria Fraksi Nomor 33K, 35K dan 36K Metabolit Sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* Secara *In Vitro*. Komisi Pembimbing, Ketua: Loeki Enggar Fitri, Anggota: Agustina Tri Endharti, Teguh Wahyu Sardjono, Roihatul Mutiah

Malaria merupakan salah satu penyakit endemik di Indonesia. Malaria disebabkan oleh infeksi parasit *Plasmodium* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk betina dari spesies *Anopheles*. Salah satu spesies yang sering digunakan sebagai model untuk infeksi malaria pada manusia adalah *Plasmodium berghei*. Parasit ini menginfeksi mencit dan mempunyai siklus hidup serta morfologi yang mirip dengan spesies *Plasmodium* yang menyebabkan malaria pada manusia. Pengobatan yang efektif merupakan elemen penting dalam pengendalian malaria. Akan tetapi, resistensi obat antimalaria muncul sebagai salah satu tantangan terbesar dalam pengendalian malaria saat ini. Salah satu usaha yang dilakukan untuk mengatasi masalah resistensi ini adalah pemanfaatan produk dari alam yang memainkan peran penting sebagai sumber zat aktif biologis dalam pengembangan obat baru. Salah satu sumber antibiotik alami pada penelitian terdahulu yang telah terbukti memiliki efek antimalaria baik secara *in vivo*, *in vitro* dan *in silico* adalah ekstrak dari *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yang bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas antimalaria fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K metabolit sekunder *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* terhadap *P. berghei* dan toksisitasnya sebagai kandidat obat antimalaria potensial baru secara *in vitro*.

Sampel penelitian ini memakai isolat *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* yang telah difermentasi dan diekstraksi oleh peneliti terdahulu untuk mendapatkan metabolit sekunder. Dari hasil fraksinasi diperoleh profil metabolit sekunder aktif dengan total 47 fraksi pada fraksinasi pertama dan 60 fraksi pada fraksinasi kedua, sehingga penelitian ini akan berfokus pada fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K. Terdapat dua uji yang akan dilakukan yaitu uji efektivitas dan uji toksisitas. Uji efektivitas dilakukan secara *in vitro* terhadap kultur *P. berghei* dengan mengamati morfologi dan menghitung densitas parasit secara mikroskopis. Kemudian hasil densitas parasit dihitung dengan rumus untuk mengetahui aktivitas penghambatan dan dapat ditentukan nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}). Pada uji efektivitas menggunakan ekstrak dengan konsentrasi 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 1.25 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 31.25 $\mu\text{g/ml}$, dan 156.25 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian, dilanjutkan uji toksisitas menggunakan prosedur MTT Assay terhadap kultur MCF-7 *Breast Cancer Cell Line*. Pada uji toksisitas menggunakan ekstrak dengan konsentrasi 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, dan 2500 $\mu\text{g/ml}$. Pembacaan hasil uji toksisitas dilakukan menggunakan *microplate reader*, kemudian dengan menghitung persentase kematian sel dapat ditentukan nilai *Lethal Concentration 50* (LC_{50}).

Pada uji efektivitas penelitian ini, terbukti fraksi 36K memiliki persentase penghambatan parasit terbaik dibandingkan fraksi 33K dan 35K. Persentase penghambatan fraksi 36K pada konsentrasi 156,25 $\mu\text{g/ml}$ adalah sebesar 52,36%. Kemudian, nilai IC_{50} fraksi 36K dihitung dengan analisis probit yaitu pada konsentrasi 135.913 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi 33K dan 35K belum dapat ditentukan nilai IC_{50} pada penelitian ini, karena dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 156,25 $\mu\text{g/ml}$ fraksi 33K dan 35K memiliki nilai presentase kematian sel sebesar 46,19% dan 44,94% (tidak mencapai 50% (IC_{50})).

Pada pengamatan morfologi dengan mikroskop, menunjukkan hasil bahwa fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K mampu merubah bentuk morfologi *Plasmodium berghei*. Hal ini ditandai dengan penemuan *crisis form* pada konsentrasi 12,25 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi yang lebih tinggi. *Crisis form* ditunjukkan dengan bentuk sel parasit yang sitoplasmanya semakin hilang dengan inti nukleus yang tertarik ke tepi sitoplasma parasit, dan kromatin yang tampak tebal, padat, serta gelap.



Uji toksisitas hanya dilakukan pada fraksi nomor 36K sebagai fraksi dengan penghambatan densitas parasit terbaik daripada fraksi 33K dan 35K. Fraksi 36K terbukti memiliki efek non toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* secara *in vitro*. Akan tetapi, nilai LC₅₀ fraksi 36K pada penelitian ini belum dapat ditentukan karena dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 2500 µg/ml, fraksi 36K memiliki nilai presentase kematian sel sebesar 23,28% (tidak mencapai 50% (LC₅₀)).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa fraksi 33K, 35K dan 36K ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* memiliki efek antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* dan bersifat tidak toksik sebagai kandidat obat antimalaria potensial baru dalam uji *in vitro*.

SUMMARY

Alif Raudhah Husnul Khotimah, NIM. 206070117111012. Postgraduate Programs Faculty of Medicine Brawijaya University Malang, Januari 9th 2023. Effectiveness and Toxicity Test of Antimalarial Fractions Numbers 33K, 35K and 36K Secondary Metabolites of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* In Vitro. Supervisor chairman: Loeki Enggar Fitri, Members: Agustina Tri Endharti, Teguh Wahyu Sardjono, Roihatul Mutiah

Malaria is one of the endemic diseases in Indonesia. Malaria is caused by an infection with the *Plasmodium* parasite which is transmitted through the bite of the female *Anopheles* mosquito. One of the species that is often used as a model for malaria infection in humans is *Plasmodium berghei*. This parasite infects mice and has a life cycle and morphology similar to *Plasmodium* species that cause malaria in humans. Effective treatment is an important element in malaria control. However, antimalarial drug resistance has emerged as one of the biggest challenges in current malaria control. One of the efforts made to overcome this problem of resistance is the utilization of products from nature, which play an important role as a source of biologically active substances in the development of new drugs. Extracts from *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* have been shown in previous studies to have antimalarial effects in vivo, in vitro, and in silico. This research is a follow-up study that aims to evaluate the antimalarial effectiveness of fractions number 33K, 35K, and 36K of secondary metabolites of *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* against *P. berghei* and its toxicity as a new potential antimalarial drug candidate in vitro.

The sample for this study used isolates of *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* that had been fermented and extracted by previous researchers to obtain secondary metabolites. From the results of the fractionation, profiles of active secondary metabolites were obtained with a total of 47 fractions in the first fractionation and 60 fractions in the second fractionation, so this study will focus on fractions 33K, 35K, and 36K. There are two tests to be carried out, namely the effectiveness test and the toxicity test. The effectiveness test was carried out in vitro on *P. berghei* culture by observing the morphology and calculating the density of the parasite microscopically. The parasite density is then calculated using a formula to determine inhibitory activity and the Inhibition Concentration (IC₅₀) value. In the effectiveness test, we used extracts with concentrations of 0.25 µg/ml, 1.25 µg/ml, 6.25 µg/ml, 31.25 µg/ml, and 156.25 µg/ml. Then, we continued the toxicity test using the MTT assay procedure on the MCF-7 breast cancer cell Line culture. In the toxicity test using extracts with concentrations of 0.25 µg/ml, 2.5 µg/ml, 25 µg/ml, 250 µg/ml, and 2500 µg/ml. The results of the toxicity test were read using a microplate reader, and by calculating the percentage of cell death, the lethal concentration 50 (LC₅₀) value could be determined.

In the effectiveness test of this study, it was proven that the 36K fraction had the best parasite inhibition percentage compared to the 33K and 35K fractions. The inhibition percentage of the 36K fraction at a concentration of 156.25 µg/ml was 52.36%. Then, the IC₅₀ value of the 36K fraction was calculated by probit analysis at a concentration of 135,913 µg/ml. The IC₅₀ value of the 33K and 35K fractions could not be determined in this study, because at the highest concentration, namely 156.25 µg/ml, the 33K and 35K fractions had a cell death percentage value of 46.19% and 44.94%, respectively or not reaching 50% of cell death (IC₅₀).

The morphological observations with a microscope showed that fraction numbers 33K, 35K, and 36K were able to change the morphology of *Plasmodium berghei*. This is indicated by the discovery of a crisis form at a concentration of 12.25 µg/ml and higher concentrations. The shape of the parasite cells, where the cytoplasm is being lost and the nuclei are being pulled to the edges of the parasite cytoplasm, and the chromatin, which appears thick, dense, and dark, indicate crisis form.



The toxicity test was only carried out on fraction number 36K as the fraction with the best inhibition of parasite density than fractions 33K and 35K. The 36K fraction has been shown to have a non-toxic effect on MCF7 Breast Cancer Cell Line in vitro. However, the LC₅₀ value of the 36K fraction in this study could not be determined because at the highest concentration of 2500 µg/ml, the 36K fraction had a cell death percentage value of 23.28% which is not reaching 50% of cell death (LC₅₀).

Based on the results of this study it can be concluded that the 33K, 35K, and 36K fractions of the metabolite extract of *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* has an antimalarial effect against *Plasmodium berghei* and is non-toxic as a candidate for a new potential antimalarial drug in vitro trials.



DAFTAR ISI

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	ii
IDENTITAS KOMITE PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS	iii
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	5
1.2.2 Sub Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat.....	7
1.4.1 Manfaat Akademik.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Malaria.....	8
2.1.1 Definisi.....	8
2.1.2 Siklus Hidup.....	8
2.1.3 Patogenesis.....	12
2.1.4 Obat Antimalaria dan Mekanisme Kerjanya.....	15
2.1.5 Resistensi Antimalaria.....	17
2.2 <i>Plasmodium berghei</i>	18
2.2.1 Karakteristik <i>Plasmodium berghei</i>	18
2.2.2 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	20
2.3 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	23



2.3.1 Karakteristik <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	23
2.3.2 Khasiat Ekstrak <i>Streptomyces</i>	24
2.3.3 Analisis Biokimia Kandungan Ekstrak <i>Streptomyces</i>	25
2.3.3.1 Eponymicin	25
2.3.3.2 Isoquinolone	26
2.3.3.3 Tryptanthrin.....	27
2.3.3.4 Terpenes.....	28
2.3.3.5 Coumarin	28
2.4 Uji Toksisitas	30
2.4.1 MTT assay.....	31
2.4.2 Kultur Sel.....	32
2.4.3 <i>Breast Cancer Cell Line</i>	33
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	35
3.1 Kerangka Konsep.....	35
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep.....	35
3.3 Hipotesis Penelitian.....	37
BAB IV METODE PENELITIAN	38
4.1 Desain Penelitian	38
4.2 Sampel Penelitian	38
4.3 Variabel Penelitian	39
4.3.1 Variabel Bebas.....	39
4.3.2 Variabel Terikat.....	39
4.4 Definisi Operasional.....	39
4.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	40
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	41
4.6.1 Uji Efektivitas Fraksi Ekstrak Metabolit Sekunder <i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	41
4.6.2 Uji Toksisitas pada Kultur MCF-7 <i>Cell Line</i>	41
4.7 Prosedur Penelitian.....	41
4.7.1 Fraksinasi Ekstrak Metabolit Sekunder Bakteri <i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	41
4.7.2 Uji Efektivitas Fraksi 33K, 35K, dan 36K Metabolit Sekunder Bakteri <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	42
4.7.2.1 Persiapan Uji Efektivitas.....	42
4.7.2.2 Pembiakan parasit <i>Plasmodium berghei</i> secara <i>in vitro</i>	43



4.7.2.3 Uji Efektivitas Antimalaria Ekstrak.....	43
4.7.2.4 Denah 48 <i>Well Microplate</i> Uji Efektivitas	44
4.7.3 Uji Toksisitas MTT Assay.....	45
4.7.3.1 Pembuatan Media Kultur.....	45
4.7.3.2 Pembuatan Media Kultur dan <i>Thawing</i> Sel.....	45
4.7.3.3 Pengembangan/Sub Kultivasi Sel.....	46
4.7.3.4 Pemeliharaan terhadap kultur sel kanker	46
4.7.3.5 Pemanenan Sel	46
4.7.3.6 Perhitungan Sel	47
4.7.3.7 <i>Plating</i> Sel.....	48
4.7.3.8 Pemaparan Ekstrak pada <i>Well Microplate</i>	48
4.7.3.9 Denah 96 <i>Well Microplate</i>	49
4.7.3.10 Penentuan LC ₅₀ menggunakan Uji MTT	49
4.8 Analisis Statistik	50
4.9 Bagan Alur Penelitian.....	51
BAB V HASIL PENELITIAN	52
5.1 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	52
5.2 Efektivitas Fraksi 33K, 35K dan 36K dalam Penghambatan Densitas Parasit <i>Plasmodium berghei</i>	54
5.3 Uji Toksisitas Fraksi 33K, 35K dan 36K	58
BAB VI PEMBAHASAN	61
6.1 Uji Efektivitas <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>Hygroscopicus</i>	59
6.2 Uji Toksisitas <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>Hygroscopicus</i>	62
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	68
7.1 Kesimpulan.....	68
7.2 Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	78



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Siklus hidup <i>Plasmodium falciparum</i> pada manusia dan nyamuk .	10
Gambar 2. 2 Perkembangan seksual <i>Plasmodium falciparum</i>	11
Gambar 2. 3 Interaksi inang-parasit tahap invasi eritrosit oleh <i>P. falciparum</i>	13
Gambar 2. 4 Model interaksi antara <i>Plasmodium</i> dan endotelium manusia	15
Gambar 2. 5 Mekanisme resistensi obat antimalaria	18
Gambar 2. 6 Siklus hidup parasit malaria pada tikus dan nyamuk.....	19
Gambar 2. 7 Morfologi fase intraeritrosit <i>P. berghei</i> pada mikroskop cahaya.....	22
Gambar 2. 8 Isolat <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>Hygroscopicus</i>	23
Gambar 2. 9 Rumus Senyawa Kimia Tryptanthrin	27
Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian.....	35
Gambar 4. 1 Denah Uji Efektivitas Fraksi Nomor 33K (a), 35K (b) dan 36K (c) .	44
Gambar 4. 2 Denah Uji Toksisitas MTT Assay	49
Gambar 4. 3 Bagan Alur Penelitian	48
Gambar 5. 1 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i> yang menginfeksi eritrosit.	52
Gambar 5. 2 Presentase Densitas Parasit Fraksi 33K, 35K dan 36K	55
Gambar 5. 3 Presentase Aktivitas Penghambatan Densitas Parasit Fraksi 33K, 35K dan 36K	56
Gambar 5. 4 Analisis Probit Nilai IC ₅₀ fraksi 36K	58
Gambar 5. 5 Formazan yang terbentuk pada Fraksi 36K	59
Gambar 5. 6 Grafik Nilai Uji Toksisitas Fraksi 36K	60



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Klasifikasi antimalaria dan mekanisme kerjanya 16

Tabel 2. 2 Deskripsi morfologi tahap infeksi *Plasmodium* 20

Tabel 4. 1 Definisi Operasional Variabel Penelitian 39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Etik Penelitian 77

Lampiran 2. Analisis Statistik Uji Efektivitas Fraksi 33K terhadap *P. berghei* 78

Lampiran 3. Analisis Statistik Uji Efektivitas Fraksi 35K terhadap *P. berghei* 81

Lampiran 4. Analisis Statistik Uji Efektivitas Fraksi 36K terhadap *P. berghei* 84

Lampiran 5. Analisis Statistik Uji Toksisitas Fraksi 36K terhadap *P. berghei* 87

Lampiran 6. Analisis Probit Uji Efektivitas Fraksi 36K terhadap *P. berghei* 89



DAFTAR SINGKATAN

ACT	: <i>artemisin-based combination therapies</i>
ART	: <i>artemisinin</i>
ATO	: <i>atovaquone</i>
DHFR	: <i>dihydrofolatereductase</i>
DMSO	: <i>Dimethyl sulfoxide</i>
FBS	: <i>fetal bovine serum</i>
HPI	: <i>hours post invasion</i>
HPLC	: <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	: <i>Inhibition Concentration 50%</i>
ICAM-1	: <i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IMC	: <i>inner membrane complex</i>
ISP4	: <i>International Streptomyces Project 4</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
LC ₅₀	: <i>Lethal Concentration 50%</i>
LCMS/MS	: <i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i>
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
LDH	: <i>Laktat Dehydrogenase</i>
LIPI	: <i>Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia</i>
MC	: <i>Medium Complete</i>
MEF	: <i>Mefloquine</i>
MSRPs	: <i>merozoite surface protein 7-related protein</i>
OD	: <i>optical density</i>
PfA-M1	: <i>Plasmodium falciparum Aminopeptidase M1</i>
PfCRT	: <i>Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter</i>
PfCYTB	: <i>Plasmodium falciparum cytochrome BC1</i>
PfDHFR	: <i>Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase</i>
PfDHPS	: <i>Plasmodium falciparum dihydropteroate synthase</i>
PfEBA	: <i>Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen</i>
PfRh	: <i>Plasmodium falciparum reticulocyte binding-like homologue protein</i>
PfEMP1	: <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>



PfMDR1 : *Protein demultidrug resistance protein-1*

PfMQO : *Plasmodium L-malate:quinone oxidoreductase*

PRO : *Proguanil*

PYR : *Pyrimethamine*

Rf : *retardation factor*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

SF-M : *serum free-media*

SUL : *Sulfadoxine*

TNF- α : *Tumour Necrosis Factor- α*

TLC : *thin-layer chromatography*

UPS : *Ubiquitin-Proteasome System*



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit infeksi yang diakibatkan oleh *Plasmodium* dengan angka prevalensi kejadian tinggi dan menyebabkan banyak kematian. Di Dunia, pada tahun 2020 diperkirakan terdapat 241 juta kasus malaria dengan angka kematian sebanyak 672.000 jiwa. Kemudian, di Benua Asia, banyak negara tropis dan subtropis menjadi negara endemik malaria, salah satunya yaitu Indonesia. Setiap tahunnya Indonesia menyumbang ratusan ribu kasus malaria. Berdasarkan *World Malaria Report*, sekitar dua pertiga dari kasus kematian akibat malaria memiliki kaitan dengan keterbatasan diagnosis, penyediaan pengobatan, maupun pencegahan penyakit malaria terutama selama masa pandemi COVID 19 (WHO, 2021).

Indonesia memiliki kedudukan sebagai negara kedua tertinggi kasus malaria di Asia Tenggara setelah India. Total kasus malaria di Indonesia pada tahun 2019 dan 2020 berturut-turut sebanyak 250.628 dan 226.364, dengan Provinsi Papua, NTT dan Papua Barat sebagai daerah dengan tingkat endemis tinggi malaria (Kemenkes RI, 2021). Di Indonesia, pada tahun 2019 terdapat penurunan angka kejadian malaria dengan 300 kabupaten/kota yang telah berhasil mengeliminasi malaria. Akan tetapi, pada tahun 2020 terdapat peningkatan angka kejadian malaria menjadi 318 kasus (Widyawati, 2021).

Pengobatan yang efektif merupakan elemen penting dalam pengendalian malaria. *World Health Organization* (WHO) telah membuat regimen kombinasi obat untuk malaria yang dikenal dengan *artemisin-based combination therapies* (ACT). Akan tetapi, resistensi obat antimalaria muncul sebagai salah satu tantangan terbesar dalam pengendalian malaria saat ini. Sejauh ini, *P. falciparum*



telah mengembangkan resistensi terhadap semua antimalaria yang digunakan terutama pada daerah Asia (Thu *et al.*, 2017). Adanya resistensi obat malaria membuat malaria menyebar ke daerah baru dan muncul kembali di daerah di mana penyakit tersebut telah diberantas sebelumnya. Hal ini akan menyebabkan peningkatan angka mortalitas dan morbiditas akibat malaria meningkat (Trasia, 2021). Sebagai upaya pengendalian penyakit malaria, penting untuk terus mencari senyawa antimalaria baru untuk mengatasi parasit malaria yang resisten terhadap obat.

Dalam pengembangan obat antimalaria baru, telah banyak penelitian yang mengembangkan produk dari alam sebagai sumber zat aktif biologis untuk melawan infeksi *Plasmodium*. Salah satu produk alam yang memiliki banyak kandungan zat aktif adalah *Streptomyces* (Ahmad *et al.*, 2017). *Streptomyces* merupakan bakteri Gram positif dari kelas *Actinobacteria*. *Streptomyces* dapat tumbuh di berbagai lingkungan dan memiliki bentuk menyerupai jamur berfilamen. *Streptomyces* terkenal dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti antitumor, antihipertensi, imunosupresan, antijamur, antibakteri, antivirus, dan antimalaria (Ahmad *et al.*, 2017; de Lima Procópio *et al.*, 2012). *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* merupakan salah satu genus *Streptomyces* yang terbukti mempunyai banyak manfaat terutama sebagai antimalaria (Fitri *et al.*, 2021; Nugraha *et al.*, 2020; Violita *et al.*, 2021).

Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* terbukti memiliki efek antimalaria baik secara *in silico*, *in vitro* maupun *in vivo* (Fitri *et al.*, 2019, 2021; Nugraha *et al.*, 2020; Rivo *et al.*, 2013; Violita *et al.*, 2021). Pada penelitian secara *in vivo* oleh Rivo *et al* (2013), ekstrak *S. hygrosopicus* diketahui mengandung eponymicin yang dapat menginaktivasi proteasom dan menghambat fungsi *Ubiquitin-Proteasome System* (UPS) *P. berghei* sehingga menginduksi perubahan morfologi serta apoptosis sel parasit



(Rivo *et al.*, 2013). Pada penelitian Fitri *et al.* (2019) juga telah membuktikan secara *in vitro* apabila ekstrak *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* mampu menyebabkan kerusakan morfologi *P. falciparum* 3D7. Selain itu ekstrak ini dapat menurunkan persentase jumlah eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* 3D7, serta menurunkan kepadatan DNA *P. falciparum* 3D7 (Fitri *et al.*, 2019). Pada penelitian Nugraha *et al.* (2020), telah diidentifikasi secara *in silico* salah satu turunan isoquinolone sebagai senyawa yang terkandung di dalam *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*. Senyawa isoquinolone ini dapat diformulasikan sebagai salah satu kandidat obat antimalaria baru (Nugraha *et al.*, 2020). Pada penelitian Fitri *et al.* (2021), senyawa lain dari ekstrak metabolit *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* yaitu triptantrin juga terbukti sebagai antimalaria secara *in vivo* maupun *in silico*. Triptantrin, salah satu alkaloid lemah terbukti memiliki aktivitas antimalaria dengan menurunkan densitas *P. berghei* secara *in vivo* dan mempengaruhi protein target eritrosit sehingga mengganggu ikatan ligan-protein secara *in silico* (Fitri *et al.*, 2021).

Pada penelitian sebelumnya, Ariel *et al.* (2021) telah melakukan ekstraksi dan fraksinasi terhadap *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada penelitian tersebut didapatkan 47 spot pada KLT hasil fraksinasi I dan 60 spot pada KLT hasil fraksinasi II (Ariel *et al.*, 2021). Kemudian, juga telah dilakukan *profiling* dan diteliti efektivitas beberapa fraksi sebagai anti malaria yaitu fraksi nomor 11, 12, 13, 15, 16, 38, 41, dan 44 (Cahyono *et al.*, 2020; Fitri *et al.*, 2021). Fraksi nomor 15 dan 16 diketahui memiliki aktivitas penghambatan densitas pertumbuhan *P. falciparum* 3D7 lebih dari 50% dengan menganalisis laktat dehidrogenase (LDH) dan *Plasmodium L-malate:quinone oxidoreductase* (PfMQO) yaitu suatu enzim dalam membran mitokondria. Fraksi 15 dan 16 juga terbukti non-toksik terhadap sel manusia dalam uji sitotoksitas (Cahyono *et al.*, 2020). Fraksi nomor 41 dan 44 telah terbukti secara *in vivo*



maupun secara *in silico* memiliki kandungan triptantrin yang mempunyai afinitas pengikatan kuat dengan protein target *Plasmodium falciparum* Amino peptidase M1 (PfA-M1), *Falcipain 2* Protease, dan *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT) sehingga dipercaya memiliki efek antimalaria (Fitri *et al.*, 2021). Adanya urgensi dalam pengembangan obat antimalaria, sehingga penting untuk dilakukan penelitian lanjutan terhadap fraksi lainnya dari ekstrak *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus*.

Penelitian antimalaria yang dilakukan secara *in vitro* di dalam laboratorium, memiliki tantangan tersendiri untuk menyiapkan model infeksi *Plasmodium* sehingga mirip dengan infeksi pada manusia. Sehingga dalam penelitian *in vitro*, banyak peneliti menggunakan model infeksi *Plasmodium* sebagai gambaran model infeksi yang sebenarnya (Raz, 2022). Salah satu genus *Plasmodium*, yaitu *P. berghei* merupakan spesies *Plasmodium* yang sering digunakan untuk organisme model infeksi malaria pada manusia (Craig *et al.*, 2012; Junaid *et al.*, 2017). Meskipun *P. berghei* tidak menginfeksi langsung manusia, akan tetapi parasite ini mempunyai beberapa keunggulan yaitu siklus hidup dan morfologi yang mirip dengan spesies *Plasmodium* pada manusia. Selain itu, *P. berghei* menyebabkan penyakit pada hewan coba dengan gejala yang mirip pada penyakit malaria di manusia (Ménard *et al.*, 2013; Venugopal *et al.*, 2020).

Selain menguji efektivitas suatu senyawa terhadap target infeksi, perlu dilakukan juga uji toksisitas untuk menilai kemanan senyawa tersebut terhadap sel dalam tubuh manusia (Powers & Sakaguchi, 2012). Uji toksisitas dapat dilakukan pada banyak jenis sel, salah satunya sel kanker yang merupakan sel spesial karena mengalami regresi ke tahap yang jauh lebih sederhana, lebih primitif, tidak seperti induk normal, dan membelah terus menerus meskipun tidak efisien. Hal ini membuat proporsi sel kanker yang jauh lebih tinggi mengalami pembelahan aktif sehingga lebih rentan terhadap obat-obatan daripada kebanyakan sel normal. Hal



ini menjadi satu pertimbangan sehingga sel kanker rutin digunakan untuk uji toksisitas suatu senyawa secara *in vitro* (Ekwall *et al.*, 1990; Popiolkiewicz *et al.*, 2005; Powers & Ronald, 2012).

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk menguji fraksi lainnya dari ekstrak *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus*. Dalam penelitian sebelumnya, Ariel *et al* (2021) telah melakukan profiling pada fraksi 33K, 35K dan 36K. Dalam tiga fraksi ini diketahui memiliki profil golongan senyawa meliputi monoterpenes, triterpenes, dan steroid (fraksinasi I) serta coumarin, scopoletin, alkaloid (fraksinasi II) yang dipercaya memiliki aktivitas antimalaria (Ariel *et al.*, 2021). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan fokus untuk menguji efektivitas antimalaria fraksi fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* terhadap *Plasmodium berghei* dan toksisitasnya sebagai kandidat obat antimalaria potensial baru pada uji *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* memiliki efek antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* dan memiliki sifat non toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* pada uji *in vitro*?

1.2.2 Sub Rumusan Masalah

1. Berapa *Inhibition Concentration* 50 (IC_{50}) fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subs. *hygrosopus* sebagai antimalaria dalam menghambat densitas pertumbuhan kultur *Plasmodium berghei* pada uji *in vitro*?



2. Bagaimana perubahan morfologi yang ditimbulkan oleh fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subs. *hygrosopus* terhadap *P. berghei*?

3. Berapa *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) fraksi dengan nilai penghambatan terbaik diantara fraksi 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subs. *hygrosopus* yang memiliki efek non toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* pada uji *in vitro*?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan efek antimalaria fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* terhadap *Plasmodium berghei* dan toksisitasnya terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* sebagai kandidat obat antimalaria potensial baru pada uji *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis *Inhibition Concentration* 50 (IC_{50}) fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopus* sebagai antimalaria dalam menghambat densitas pertumbuhan kultur *Plasmodium berghei* pada uji *in vitro*

2. Mengamati perubahan morfologi yang ditimbulkan oleh fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopus* terhadap *P. berghei*

3. Menganalisis *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopus* yang memiliki efek non toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* pada uji *in vitro*



1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini dapat memberikan tambahan ilmu dan informasi dalam kemajuan ilmu parasitologi, mikrobiologi dan farmakologi mengenai aktivitas fraksi ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* sebagai antimalaria.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat menjadi dasar kajian dalam pengembangan terapi malaria dari senyawa metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Definisi

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi mengancam jiwa yang disebabkan oleh parasit dari genus *Plasmodium*. Parasit ini menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk betina *Anopheles* yang sebelumnya telah terinfeksi oleh *Plasmodium* (Talapko *et al.*, 2019). *Plasmodium* terdiri dari banyak spesies dan hingga kini telah diketahui sebanyak 172 spesies *Plasmodium*. Lima spesies *Plasmodium* yang memiliki kemampuan menginfeksi manusia antara lain yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* dan *P. knowlesi*. *Plasmodium falciparum* diketahui dapat menyebabkan gejala penyakit yang berat pada manusia hingga menyebabkan kematian (Lee *et al.*, 2022; Talapko *et al.*, 2019).

2.1.2 Siklus Hidup

Plasmodium tumbuh dan berkembang di berbagai lingkungan inang serta memiliki siklus hidup yang kompleks, baik di dalam nyamuk *Anopheles* sebagai inang definitif dan pada vertebrata yang merupakan inang perantara. Siklus hidup malaria terdiri dari tahap seksual dan tahap aseksual. Sebagian besar spesies *Plasmodium* memiliki jumlah sel tertinggi selama replikasi aseksual dalam sirkulasi eritrosit inang vertebrata. Kemudian sebagian kecil dari sel parasit aseksual tersebut berdiferensiasi menjadi tahap seksual dan melanjutkan siklusnya saat berada di inang definitif nyamuk (Venugopal *et al.*, 2020).

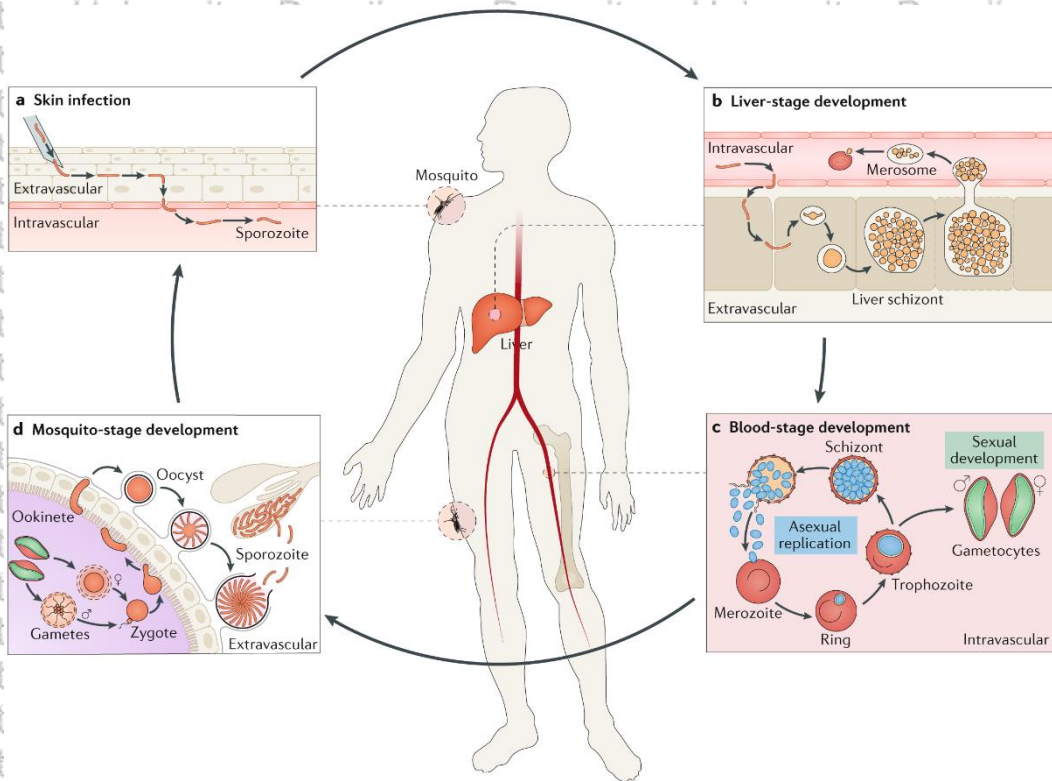
Tahap aseksual dimulai saat nyamuk yang terinfeksi menghisap darah dari vertebrata, ia juga menyuntikkan sporozoit ke dalam tubuh manusia. Sporozoit motil tersebut akan memasuki aliran darah, yang memungkinkannya mencapai hati dan lolos dari imunitas inang serta sistem limfatik. Setelah sporozoit mencapai



sinusoid hati, mereka melewati penghalang sinusoidal dan masuk ke dalam hepatosit. Pada sel heparosit sporozoit akan membentuk vakuola parasitofor dan berdiferensiasi dalam siklus pertama replikasi aseksual. Selama 2 hari hingga beberapa hari (tergantung pada spesies), akan terbentuk skizon yang mengandung ribuan merozoit dan akan keluar dari hepatosit (Venugopal *et al.*, 2020).

Merozoit dikelompokkan dalam vesikel terikat membran yang disebut merosom dan dilepaskan kembali ke aliran darah melalui sinusoid hati. Setelah itu, merozoit akan menginvasi eritrosit dan berkembang dari tahap cincin menjadi trofozoit kemudian menjadi skizon. Skizon dewasa akan pecah dan melepaskan merozoit yang memulai siklus replikasi aseksual kedua. Siklus replikasi aseksual ini menghasilkan hingga 32 merozoit selama 24–72 jam (bervariasi antar spesies).

Melalui proses replikasi berulang, proses invasi dan pertumbuhan, parasit akan membentuk infeksi akut. Beberapa spesies, seperti *P. vivax* hanya menginfeksi terbatas pada retikulosit yang membentuk sebagian kecil eritrosit yang bersirkulasi, sehingga tidak terjadi parasitemia total dalam tubuh manusia. Akan tetapi, pada infeksi *P. falciparum* tidak terbatas sehingga dapat menginfeksi sebagian besar sel eritrosit. Hal ini menyebabkan parasitemia yang tinggi, dan menjadi faktor yang berimplikasi pada kapasitas *P. falciparum* untuk menyebabkan penyakit parah hingga kematian (Venugopal *et al.*, 2020).

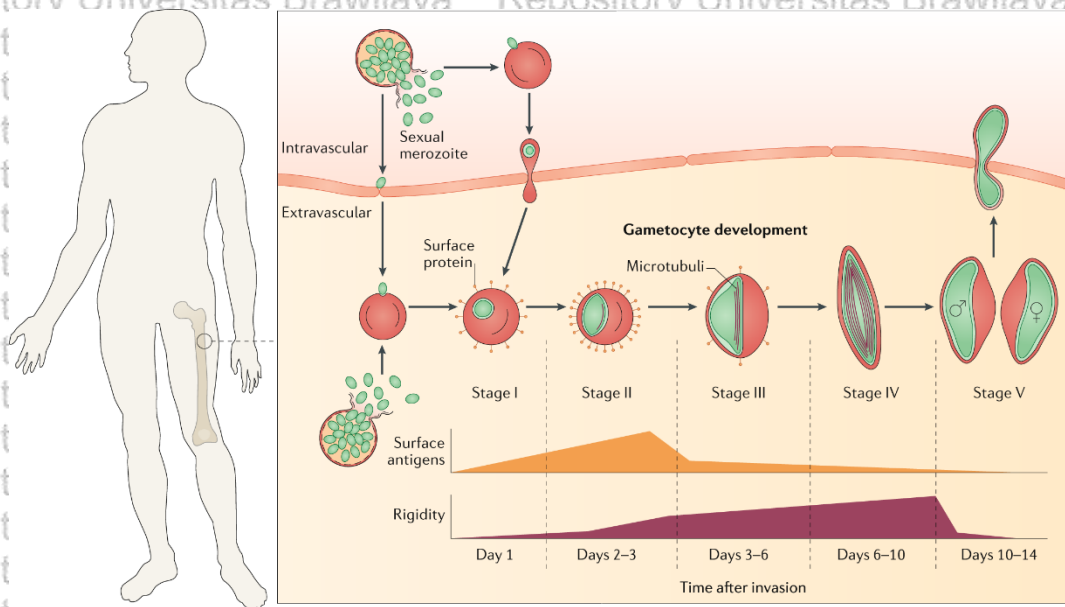


Gambar 2. 1 Siklus hidup *Plasmodium falciparum* pada manusia dan nyamuk

a | Sporozoit *P. falciparum* (oranye) masuk ke dalam kulit pada saat nyamuk yang terinfeksi menghisap darah manusia. Sporozoit akan bermigrasi dan memasuki kapiler darah. b | Melalui aliran darah, sporozoit mencapai sinusoid hati dan meninggalkan sirkulasi darah untuk menyerang hepatosit, setelah beberapa peristiwa transmigrasi. Dalam hepatosit, mereka menjalani satu siklus replikasi aseksual yang menghasilkan skizon hati yang mengandung ribuan merozoit (kuning). Merozoit memasuki aliran darah dalam struktur terikat membran yang disebut merosom. Setelah dilepaskan, merozoit menginfeksi eritrosit (merah) untuk memulai siklus parasit intra-eritrositik. c | Di dalam darah, *P. falciparum* mengalami siklus replikasi aseksual (biru). Setelah invasi eritrosit, mereka berkembang dari tahap cincin menjadi trofozoit dan kemudian menjadi skizon. Skizon dewasa meledak untuk melepaskan merozoit yang memulai siklus replikasi lain. Terdapat subpopulasi parasit yang berkomitmen untuk menghasilkan keturunan seksual atau gametosit jantan dan betina (hijau). d | Nyamuk *Anopheles* betina mengambil gametosit saat memakan darah manusia yang terinfeksi. Gametosit jantan dan betina menjalani gametogenesis di dalam usus tengah nyamuk. Gamet kemudian saling membuahi untuk membentuk zigot (oranye), yang selanjutnya berkembang menjadi ookinet motil. Ookinet melintasi epitel usus tengah untuk membentuk ookista di bawah lamina basal. Dalam ookista, ribuan sporozoit terbentuk, yang ketika dinding ookista pecah kemudian akan masuk ke hemolimfa untuk menyerang kelenjar ludah nyamuk. Dari sana, sporozoit ditransmisikan ke manusia selama gigitan nyamuk berikutnya, menutup siklus hidup parasit yang kompleks (Venugopal *et al.*, 2020).

Tahap seksual *Plasmodium* dimulai dari merozoit yang juga berdiferensiasi menjadi gametosit jantan dan betina. Bergantung pada spesiesnya, pada tahap seksual perkembangan gametosit berlangsung selama 1–12 hari, kemudian menghasilkan bentuk jantan dan betina. Pada hari ke 9-12, *P. falciparum* memiliki

perkembangan gametosit terpanjang, yang mencakup lima fase yang berbeda secara morfologis (stadium I–V). Gametosit akan bersirkulasi dalam darah manusia selama beberapa hari, kemudian saat nyamuk *Anopheles* menggigit kulit manusia tersebut terjadi penularannya ke nyamuk. Setelah gametosit memasuki *midgut* nyamuk, gametosit jantan dan betina akan menggunakan protease untuk keluar dari eritrosit. Kemudian gametosit jantan dan betina akan berdiferensiasi masing-masing menjadi delapan mikrogamet dan satu makrogamet, yang bergabung untuk menghasilkan zigot. Setelah itu, zigot akan berkembang menjadi ookinet motil yang akan melintasi lapisan epitel dinding usus tengah nyamuk untuk membentuk ookista di bawah lamina basal. Dalam ookista, terjadi siklus ketiga replikasi aseksual sehingga menghasilkan ribuan sporozoit. Kemudian, sporozoit ini akan masuk ke dalam hemolimfa hingga mencapai kelenjar ludah nyamuk. Sporozoit tetap berada di sana sampai ditransmisikan ke inang vertebrata baru melalui gigitan nyamuk untuk memulai siklus lagi (Venugopal *et al.*, 2020).



Gambar 2. 2 Perkembangan seksual *Plasmodium falciparum*

Sebuah subset dari skizon yang berkomitmen untuk siklus seksual, menghasilkan merozoit seksual. Merozoit dan gametosit muda (hijau) meninggalkan sinusoid kemudian memasuki parenkim sumsum tulang. Dalam parenkim sumsum tulang, gametosit berkembang dari stadium I ke stadium IV. *Remodeling* membran eritrosit inang (merah) menghasilkan deposisi sementara antigen permukaan (orange) dan peningkatan reversibel dalam



rigiditas seluler (ungu). Deformabilitas yang dipulihkan selama pematangan ke gametosit stadium V memicu pelepasannya kembali ke aliran darah, sehingga dapat terambil selama gigitan nyamuk lain. Replikasi aseksual di parenkim sumsum tulang kemungkinan besar berkontribusi pada akumulasi parasit aseksual dan komitmen seksual di kompartemen ini (Venugopal *et al.*, 2020).

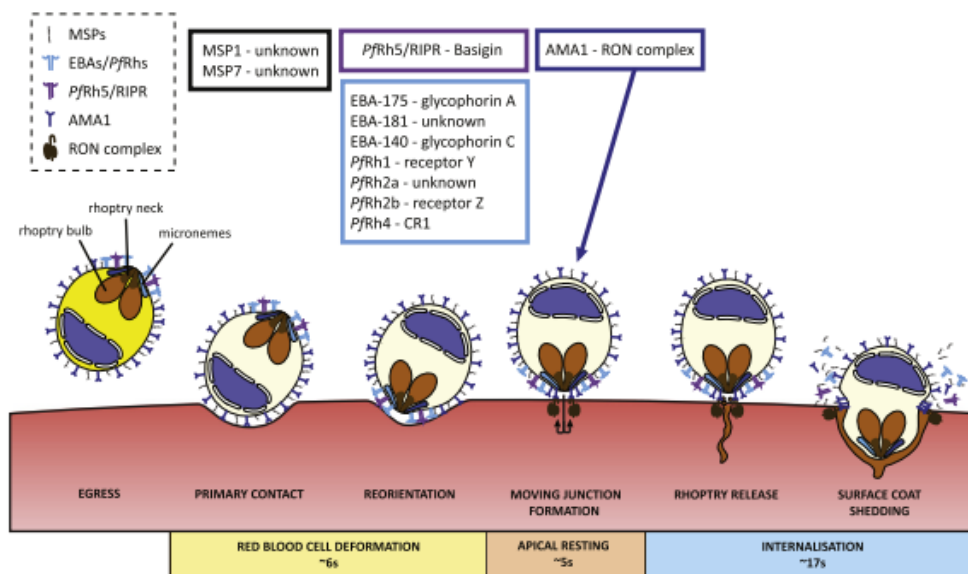
2.1.3 Patogenesis

Patogenesis infeksi *Plasmodium* terhadap sel eritrosit terdiri dari beberapa proses, yaitu egress, kontak primer, reorientasi, pembentukan persimpangan (*junction*), dan proses invasi. Sebagai organisme intraseluler obligat, parasit malaria menginvasi eritrosit untuk tumbuh dan bereplikasi. Bentuk invasif parasit malaria yaitu merozoit akan menyerang eritrosit melalui proses yang melibatkan kontak awal dengan eritrosit. Kemudian terjadi reorientasi ujung apikal merozoit untuk memungkinkan perlekatan dekat dengan permukaan eritrosit. Kemudian akan terjadi pergerakan progresif menuju ujung posterior parasit sampai fusi membran sel inang selesai. Langkah-langkah dalam invasi ini bergantung pada interaksi spesifik antara beberapa adhesin parasit dan reseptor eritrosit inangnya masing-masing (Schmidt *et al.*, 2015).

Proses invasi eritrosit dilakukan oleh parasit pada tahap infeksi intra-eritrositik yang terjadi pada tahap merozoit. Proses invasi ini dilakukan menggunakan motor molekuler internal berdasarkan aktin dan miosin untuk mendorong dirinya sendiri ke dalam eritrosit. Proses invasi eritrosit oleh merozoit secara konseptual dapat dibagi menjadi beberapa langkah. Pertama, invasi dimulai dengan afinitas yang rendah dan jarak yang jauh (12-40 nm). Kemudian terjadi pengikatan secara tidak langsung oleh merozoit hingga puncak merozoit dapat berhubungan dengan eritrosit. Setelah terjadi interaksi jarak dekat (4 nm atau kurang) maka proses invasi akan mengarah ke pembentukan persimpangan atau eritrosit-merozoit *junction*. Struktur eritrosit-merozoit *junction* ini berperan sebagai lubang yang dilalui merozoit selama invasi dan memisahkan membran

eritrosit dari membran vakuolar sehingga dapat menyatu untuk membentuk vakuola parasitoforus tempat parasit bergerak dan berkembang setelah invasi (Dasgupta *et al.*, 2014).

Proses patogenesis infeksi *Plasmodium* terhadap eritrosit ini difasilitasi oleh susunan protein permukaan merozoit (MSPs). Protein ini secara permanen membentuk pola permukaan parasite. Kemudian antigen parasit yang disekresikan secara apikal, dilepaskan saat keluar dari sel yang terinfeksi sebelum masuk kembali. Banyak dari kelompok antigen protein permukaan merozoit dapat dijadikan kandidat utama dalam perkembangan vaksin untuk mencegah infeksi *Plasmodium* stadium eritrosit. Kelompok ini termasuk antigen membran apikal (AMA)-1, antigen pengikat eritrosit, dan antigen protein pengikat retikulum homolog (Rh) (Dasgupta *et al.*, 2014).



Gambar 2. 3 Interaksi inang-parasit tahap invasi eritrosit oleh *P. falciparum*.

Pasangan reseptor-ligan dengan peran dalam invasi tercantum dalam kotak. Protein yang dikodekan parasit ditampilkan dalam kuncinya. **Egress:** lingkungan yang rendah kalium memicu peningkatan kalsium sitosol (kuning) dan pelepasan protein efektor mikronem ke permukaan. **Kontak primer:** merozoit menempel secara reversibel ke eritrosit melalui protein permukaan merozoit yang ditambatkan glikosilfosfatidilinositol (hitam) dan pasangannya yang terkait. **Reorientasi:** kontak primer menimbulkan gelombang deformasi dalam eritrosit, menghasilkan reorientasi parasit. Konsentrasi adhesin apikal seperti ligan pengikat eritrosit dan ligan *reticulocyte binding-like homolog* (PfRh) (biru



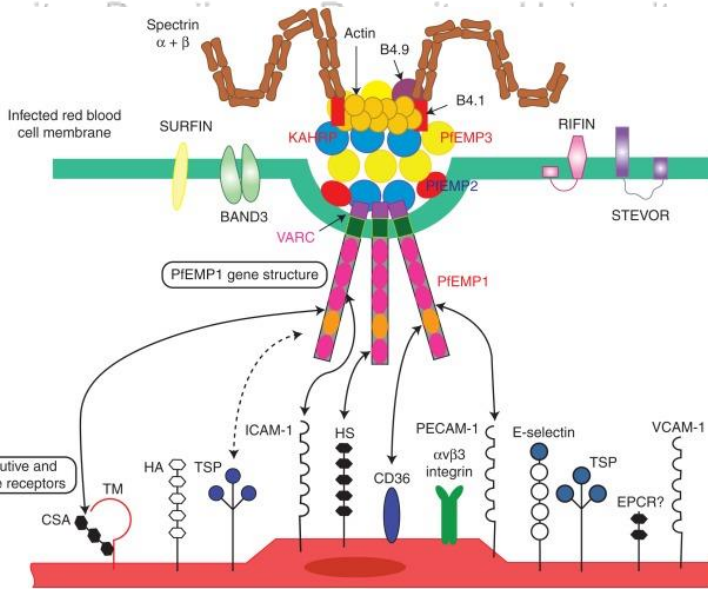
muda) atau protein yang berinteraksi dengan PfRh5/Rh5 (ungu) mengikat sel inang untuk menahan parasit di tempatnya selama bergerak. **Pembentukan persimpangan:** parasit tetap menempel di apikal untuk memungkinkan translokasi kompleks protein *rho*try (coklat) ke dalam eritrosit dan antigen membran apikal (biru tua) yang terkumpul di ujung apikal. Pengikatan kompleks AMA1-RON memicu pembentukan aposisi persimpangan yang bergerak antara merozoit dan sel inang tempat parasit menyerang. **Invasi:** selama penetrasi inang, ligan permukaan dilepaskan dan parasit menyerang ke dalam vakuola parasitophorus melalui sekresi *rho*tries ke dalam sel inang (Harvey *et al.*, 2012).

Dalam kasus infeksi *P. falciparum* yang memiliki gejala berat, selama fase awal infeksi malaria, stimulasi makrofag menyebabkan produksi *Tumor Necrosis*

Factor- α (TNF- α). Peningkatan produksi TNF- α merangsang molekul yang melekat di endotelium otak seperti *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1).

Rangsangan tersebut dan rangsang lainnya menyebabkan berbagai peristiwa *up-regulasi*. Sejumlah besar parasit malaria dapat berikatan melalui *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP-1) ke ubiquitous molekul seperti CD36 (trombosit dan endotelium di luar otak), yang secara logis menjelaskan terjadinya trombositopenia pada infeksi malaria serta insiden cerebral malaria (Milner, 2018).

Sampai saat ini, dua keluarga gen *P. falciparum* telah diidentifikasi terlibat dalam pengenalan dan pengikatan pada reseptor permukaan eritrosit yaitu; antigen pengikat eritrosit atau *Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen* (PfEBAS) dan protein homolog pengikat retikulosit atau *Plasmodium falciparum reticulocyte binding-like homologue protein* (PfRhs). Semua anggota famili ini diekspresikan dan berfungsi kecuali EBA-165 dan PfRh3, yang tampaknya mengkode pseudogene (Schmidt *et al.*, 2015).



Gambar 2. 4 Model interaksi antara *Plasmodium* dan endotelium manusia

Sebuah model interaksi antara parasit *Plasmodium* (terutama dari *Plasmodium falciparum*, atas) dan endotelium manusia (bawah). Fitur yang menonjol adalah molekul *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) yang terbuat dari kombinasi protein manusia dan parasit dalam ikatan yang kompleks. Surfin, rifin, dan stevor dari parasit juga terletak pada membran eritrosit. Pada sel tubuh manusia, berbagai molekul tergantung pada jaringan yang terlibat dalam interaksi parasit yang terinfeksi, antara lain yang selalu ada di endotelium (misalnya, CD36 di luar otak dan pada trombosit), atau yang ada selama aktivasi misalnya, molekul intraselular ICAM-1, dan diaktifkan selama interaksi dengan molekul lain (misalnya, reseptor protein C endotel [EPCR] dan trombospondin [TSP]). Situasi jaringan khusus termasuk kondroitin sulfat (CSA) di plasenta dan CR-1 pada eritrosit yang tidak terinfeksi (yang memediasi pembentukan roset) (Milner, 2018).

2.1.4 Obat Antimalaria dan Mekanisme Kerjanya

Obat-obatan malaria yang digunakan saat ini menargetkan berbagai tahap siklus hidup malaria meskipun sebagian besar bekerja pada fase intra-eritrositik dari perkembangan parasit malaria (Greenwood *et al.*, 2008). Malaria saat ini diobati dengan menggunakan terapi kombinasi yang telah dilaporkan menjadi pendekatan yang baik dalam melawan tantangan global malaria *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap obat antimalaria. WHO telah membuat regimen kombinasi obat untuk malaria yang dikenal dengan *artemisinin-based combination therapies* (ACT). ACT meliputi banyak kombinasi regimen obat antara lain yaitu dihydroartemisinin-piperazine, artemether-lumefantrine, artesunate-mefloquine,

artesunate-amodiaquine, dan artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine (Mhlwatika & Aderibigbe, 2018; Thu *et al.*, 2017).

Mefloquine-artesunate menyembuhkan 98% pasien dengan malaria *falciparum* yang sangat resisten di perbatasan Thailand-Burma. Atovaquone-proguanil adalah 100% efektif di Thailand pada orang dewasa. Resistensi terhadap klorokuin dapat diobati dengan meflokuin atau primakuin.

Menggabungkan salah satu obat selama tujuh hari dengan kina, meflokuin atau artesunat menghasilkan hasil pengobatan yang efektif, melebihi 94% terhadap malaria *falsiparum* di Thailand. Meskipun penerapan terapi kombinasi berhasil untuk pengobatan infeksi malaria, ada beberapa kekurangan yang terkait dengan kombinasi obat. Ini termasuk biaya tinggi, profil farmakokinetik yang berbeda, toksik dan avaibilitas yang buruk (Mhlwatika & Aderibigbe, 2018)

Tabel 2. 1 Klasifikasi antimalaria dan mekanisme kerjanya

Antimalarials	Classification	Mode of Action	Polymer Carriers
Primaquine	Hypnozoitocidal and gametocytocidal	Primaquine interferes with the electron transport in the parasite during respiration process	Nanoliposomes Dendrimers Polymer drug conjugates
Chloroquine	Blood schizontocides	Chloroquine accumulate in the acidic food vacuoles of intraerythrocytic trophozoites and thereby prevent haemoglobin degradation	Nanoliposomes Hydrogels Dendrimers
Artemisinin Dihydroartemisinin	Gametocytocidal	Involves the heme-mediated decomposition of the peroxide bridge to produce carbon-centred free radicals	Micelles Polymer-drug conjugates
Curcumin	Blood schizontocides	Curcumin inhibits the activity of enzymes and lipid peroxides	Hydrogels
Artemether Beta-Artemether	Gametocytodal	It acts against erythrocytic stages of <i>P. falciparum</i> and inhibits nucleic acid and protein synthesis.	Micelles Nanoliposomes
Lumefantrine	Blood schizontocides	Lumefantrine is believed inhibits nucleic and formation of β -hematin by forming a complex with hemin	Nanoliposomes Hydrogels

Sumber: (Mhlwatika & Aderibigbe, 2018)

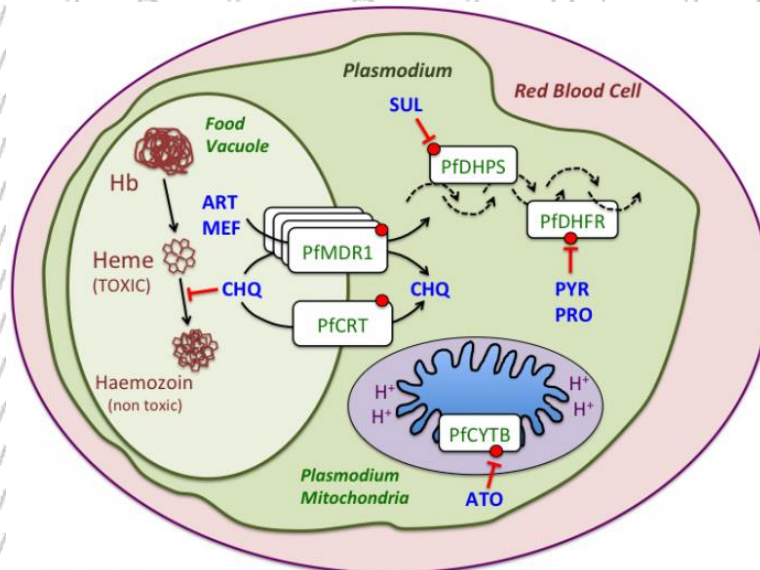


2.1.5 Resistensi Antimalaria

Obat-obatan malaria yang digunakan saat ini menargetkan berbagai tahap siklus hidup malaria meskipun sebagian besar bekerja pada fase intra-eritrositik dari perkembangan parasit malaria (Greenwood *et al.*, 2008). Malaria saat ini diobati dengan menggunakan antimalaria seperti klorokuin, primakuin, kurkumin, lumefantrine dan artemisinin serta turunannya. Akibatnya, hampir semua obat tersebut mengalami resistensi. Malaria *falciparum* yang resisten terhadap obat antomalaria menyebabkan demam parah dan anemia serta lebih dari satu juta kematian setiap tahun. Resistensi obat antimalaria terjadi ketika parasit malaria bertahan hidup dan berkembang biak dalam konsentrasi obat yang diberikan yang pada umumnya mampu membunuh dan mencegah perkembangbiakannya.

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi muncul dan penyebaran malaria yang resisten terhadap obat. Faktor-faktor tersebut antara lain biaya pengobatan yang tinggi, ketidaksesuaian farmakokinetik obat, dosis yang salah dan kepatuhan pasien yang buruk (Mhlwatika & Aderibigbe, 2018).

Mekanisme resistensi antimalaria sangat kompleks, bervariasi dan dipengaruhi oleh beberapa gen. Mekanisme resistensi klorokuin diyakini karena proses kematian parasit yang terjadi lebih cepat daripada kerja obat klorokuin. Efluks ini mengeluarkan obat klorokuin sebelum mencapai tingkat yang diperlukan untuk penghambatan membebaskan hemoglobin. *P. falciparum chloroquine resistance transporter* (PfCRT) juga berkontribusi terhadap resistensi parasit terhadap obat chloroquine. Resistensi pirimetamin/sulfadoksin dikaitkan dengan adanya mutasi *dihydrofolatereductase* (DHFR). Mutasi ini menurunkan efektivitas pirimetamin/sulfadoksin selama pengobatan malaria (Mhlwatika & Aderibigbe, 2018).



Gambar 2. 5 Mekanisme resistensi obat antimalaria

Mutasi yang diketahui mengakibatkan resistensi terhadap obat antimalaria ditandai dengan lingkaran merah. Klorokuin (CHQ) memberikan efek berbahaya pada *Plasmodium* dengan mengganggu detoksifikasi produk sampingan heme yang terbentuk dalam vakuola makanan parasit. Mutasi *chloroquine resistance transporter* (PfCRT) serta peningkatan salinan *protein multidrug resistance protein-1* (PfMDR1) dapat mengakibatkan resistensi terhadap klorokuin dengan mengurangi konsentrasinya dalam vakuola pencernaan. Mutasi PfMDR1 juga terlibat dalam resistensi terhadap mefloquine (MEF) dan turunan artemisinin (ART). Mutasi pada target molekuler untuk Pyrimethamine (PYR) & Proguanil (PRO) yaitu *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase* (PfDHFR), Sulfadoxine (SUL) yaitu *Plasmodium falciparum dihydropteroate synthase* (PfDHPS), dan atovaquone (ATO) yaitu *Plasmodium falciparum cytochrome BC1* (PfCYTB) juga telah diidentifikasi (Ding *et al.*, 2012)

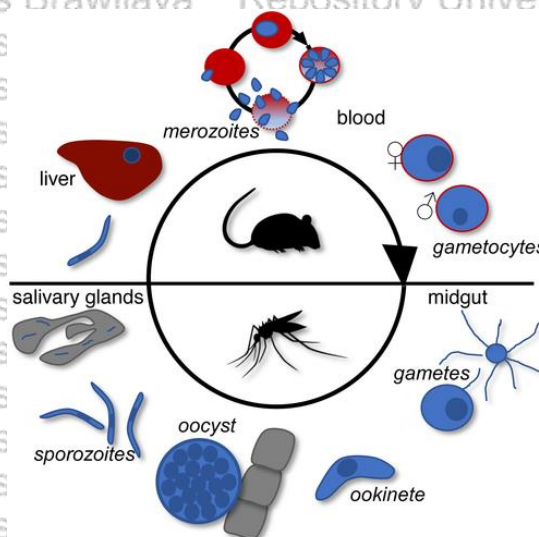
2.2 *Plasmodium berghei*

2.2.1 Karakteristik *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei adalah salah satu spesies yang sering digunakan sebagai organisme model untuk infeksi malaria pada manusia. *Plasmodium berghei* merupakan parasit protozoa yang menyebabkan malaria di beberapa rodent (Craig *et al.*, 2012; Junaid *et al.*, 2017). *Plasmodium berghei* ditemukan pada tahun 1948 di *Grammomys surdaster* (tikus pohon Afrika), kemudian pada tahun 1965, sporozoit *P. berghei* terbukti menghasilkan skizon di hati tikus laboratorium. Sejak itu, *P. berghei* dan spesies saudaranya *Plasmodium yoelii*, keduanya sering digunakan untuk penelitian genetika molekuler dan telah menjadi

model yang praktis dan kuat dalam berbagai macam penelitian (Ménard *et al.*, 2013).

Meskipun *P. berghei* tidak menginfeksi langsung manusia akan tetapi *P. berghei* mempunyai beberapa keunggulan karena siklus hidup dan morfologi yang mirip dengan spesies *Plasmodium* lainnya. Selain itu, *Plasmodium berghei* menyebabkan penyakit pada hewan coba dengan gejala yang mirip pada penyakit malaria di manusia (Ménard *et al.*, 2013; Venugopal *et al.*, 2020). Dalam penelitian Menard *et al.* (2013) dengan penggambaran secara visual, sporozoit *P. berghei* yang diinokulasikan ke dalam kulit menunjukkan perkembangan di area dermis, epidermis dan folikel rambut. Meskipun sebagian besar parasit kulit mati sebelum menyelesaikan perkembangan intraselulernya, sporozoit *P. berghei* dan *P. yoelii* dapat berkembang membentuk merozoit di dalam sel kulit, kemungkinan di fibroblas dermal (Ménard *et al.*, 2013).



Gambar 2. 6 Siklus hidup parasit malaria pada tikus dan nyamuk. Parasit digambarkan berwarna biru, jaringan nyamuk berwarna abu-abu, hati berwarna merah tua, dan eritrosit berwarna merah (Saeed *et al.*, 2020)



2.2.2 Morfologi *Plasmodium berghei*

Pengenalan morfologi parasit malaria terdiri dari pengenalan dua ciri khas yaitu (1) inti/kromatin yang tampak berbentuk bulat dan berwarna merah, (2) sitoplasma umumnya berwarna biru yang tampak bulat seperti cincin (*ring form*) atau bentuknya bisa juga tidak teratur. Pada fase intraeritrosit atau fase aseksual, pertama pada sel hati merozoit akan pecah, selanjutnya menginfeksi eritrosit dan berkembang menjadi trophozoit. Setelah itu trophozoit akan terus berkembang menjadi skizon immatur dan skizon matur dengan inti yang semakin banyak hingga berkembang menjadi merozoit kemudian akan rupture dan membebaskan merozoit untuk menginfeksi eritrosit lainnya lagi. Siklus ini akan berlanjut terus menerus sebanyak tiga kali, kemudian akan terjadi perkembangan bentuk gametosit dari sebagian merozoit dan apabila terhisap oleh nyamuk *Anopheles sp* betina, maka akan terjadi siklus seksual di dalam tubuh nyamuk (Kemenkes RI, 2017).

Tabel 2. 2 Deskripsi morfologi tahap infeksi *Plasmodium*













Stadium	Keterangan	Morfologi
Trophozoite	<p>Stadium paling umum ditemukan pada infeksi <i>Plasmodium</i> adalah trophozoit. Trophozoit memiliki sebagai stadium cincin atau sering disebut <i>ring form</i>. <i>Ring form</i> tampak seperti cincin tipis dengan warna sitoplasma kebiruan. Trophozoit bervakuola dan dapat berbentuk amoeboid, dengan ukuran sekitar 1,25 -1,5 μm.</p> <p>Trophozoit dikenal juga sebagai stadium pertumbuhan, sehingga memiliki variasi ukuran dari ukuran yang kecil hingga cukup besar. Trophozoit terkadang tampak memiliki pigmen sebagai hasil metabolisme parasite dengan variasi warna dari kuning pucat hingga coklat kehitaman ataupun hitam.</p>	



<p>Schizont</p>	<p>Skizon merupakan stadium dimana dapat terlihat inti yang membelah menjadi 2, 4, 6 dan seterusnya. Setiap skizon mengandung dua atau empat merozoit dan kumpulan pigmen berwarna gelap. Pembelahan terjadi secara aseksual tanpa adanya keterlibatan dari sel kelamin jantan maupun betina.</p> <p>Terdapat beberapa fase pada stadium skizon yaitu dimulai dari parasit yang memiliki dua inti dan berkembang hingga banyak inti dengan sitoplasma pada masing-masing intinya.</p>	
<p>Gametocyte</p>	<p>Stadium seksual pada <i>Plasmodium</i> adalah gametosit. Gametosit akan tumbuh dalam nyamuk <i>Anopheles</i> betina menjadi sel gamet jantan ataupun betina. Bentuk gametosit beragam, biasanya memiliki bentuk seperti bulan sabit atau pisang dengan ujung bulat atau runcing tergantung spesiesnya dapat memiliki perbedaan. Dalam membedakan sel kelamin dapat melihat dari warna sitoplasma parasit. Terdapat dua jenis gametosit yaitu sel kelamin betina (makrogametosit) dan sel kelamin jantan (mikrogametosit).</p>	

Sumber: (Kemenkes RI, 2017)

PLASMODIUM BERGHEI

hpi	characteristics	LM morphology		
0-4	invasion (reticulocytes)			
4-8	intra cellular growth			
8-12	susceptible to sexual commitment			
12-18	sexuality determined			
18-20	schizogony, sexuality manifest			
20-22	sexual dimorphism not visible			
22-23	schizogony completed			
23-26	sexual dimorphism visible			
26-27	gametocytogenesis completed			
30-48	stable gametocyaemia			
48-57	degeneration of gametocytes			

From: B. Mons (1986), Acta Leidensia 54.

Gambar 2. 7 Morfologi fase intraeritrosit *P. berghei* pada mikroskop cahaya

Fase intraeritrosit yang ditunjukkan pada gambar berasal dari infeksi stadium darah *P. berghei* strain ANKA dengan pewarnaan giemsa yang telah disinkronkan pada beberapa titik waktu setelah invasi merozoit ke dalam eritrosit (*hours post invasion* = hpi) (Mons, 1986)



2.3 *Streptomyces hygrosopicus*

2.3.1 Karakteristik *Streptomyces hygrosopicus*

Streptomyces hygrosopicus adalah spesies bakteri dalam genus *Streptomyces* dan kelas *Actinobacteria*. Bakteri ini termasuk dalam genus bakteri Gram positif. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk berkembang dalam berbagai keadaan lingkungan. Bakteri ini memiliki bentuk menyerupai jamur yang memiliki filament. Ada keterlibatan dalam pembentukan lapisan hifa *Streptomyces* pada proses diferensiasi morfologinya menjadi rantai spora. Selain itu, genus bakteri ini mempunyai ciri perkembangan multiseluler yang kompleks. Bakteri ini memiliki spora dengan pigmen dan aroma pada beberapa spesies sebagai salah satu kemampuannya untuk tetap dapat hidup pada lingkungan yang ekstrem. Aroma pada spora bakteri ini juga bisa merangsang produksi metabolit sekunder dan perkembangan sel (de Lima Procópio *et al.*, 2012).



Gambar 2. 8 Isolat *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus*. *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* memiliki spora yang akan berkecambah terlebih dahulu kemudian terjadi pembentukan hifa dan dari miselium udara multinuclear terbentuk septa kemudian berubah menjadi spora yang memiliki inti (Waksman & Henrici, 1948)



Actinobacteria terdiri dari kelompok Gram-positif dengan ciri khas kaya akan GC (70%) pada materi genetiknya apabila dibandingkan dengan *Escherichia coli* (50%) maupun bakteri lain. *Streptomyces* memiliki kegunaan paling banyak dan paling serbaguna diantara mikroorganisme tanah lainnya. Hal ini didukung oleh proses biotransformasi dan tingkat produksi metabolit yang besar (de Lima Procópio *et al.*, 2012).

2.3.2 Khasiat Ekstrak *Streptomyces*

Streptomyces memiliki banyak kecakapan dalam memproduksi golongan senyawa dan senyawa bioaktif yang memiliki berbagai khasiat, antara lain sebagai antitumor, antihipertensi, immunosupresan, serta dapat digunakan untuk melawan infeksi jamur, virus, dan bakteri (de Lima Procópio *et al.*, 2012). Pada penelitian Fitri *et al.* (2019), ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* terbukti memiliki kemampuan untuk menyebabkan kerusakan morfologi, menurunkan densitas eritrosit yang terinfeksi parasit dan densitas DNA *P. falciparum* 3D7 *in vitro*. Ekstrak metabolit ini dapat mempengaruhi morfologi hampir semua stadium aseksual parasit. Pada stadium skizon dan trofozoit tampak gagal tumbuh kemudian rusak dengan inti piknotik dan hilangnya kandungan sitoplasma. Selain itu, densitas eritrosit yang terinfeksi parasit telah terbukti menurun sejak awal paparan (0,02 mg/ml ekstrak) serta terdapat hubungan yang bermakna antara konsentrasi ekstrak dengan densitas eritrosit terinfeksi parasit serta densitas DNA parasit (Fitri *et al.*, 2019).

Metabolit sekunder *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* mengandung suatu proteasome inhibitor yaitu eponemisin. Proteasom adalah kompleks multisubunit yang diekspresikan di banyak sel eukariotik dan memiliki fungsi untuk mendegradasi protein yang ditargetkan oleh sistem ubiquitinasi. Degradasi protein yang dimediasi proteasome merupakan proses yang diatur dan diperlukan untuk berbagai proses intraseluler, seperti pemrosesan antigen, aktivasi *nuclear factor*



kB dan proses dalam siklus sel. Proteasome diperlukan untuk pertumbuhan dan pembelahan sel, sehingga telah diusulkan bahwa penghambatan proteasome dapat berfungsi sebagai terapi antitumor. *Streptomyces hygroscopicus* dapat menghasilkan antibiotik eponemisin baru yang menunjukkan efek antitumor *in vivo* spesifik terhadap melanoma B16 (Rivo *et al.*, 2013).

2.3.3 Analisis Biokimia Kandungan Ekstrak *Streptomyces*

Ekstrak *Streptomyces hygroscopicus* juga memiliki beberapa kandungan golongan senyawa antimalarial, meliputi eponymicin, isoflavin, dan tryptanthrin (Fitri *et al.*, 2019; Fitri *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian sebelumnya telah diketahui hasil TLC fraksinasi I dan II dari golongan senyawa metabolit sekunder beberapa fraksi ekstrak *Streptomyces hygroscopicus*. Fraksi 33K, 35K dan 36K diketahui mengandung golongan senyawa monoterpenes, triterpenes, steroid, coumarin, scopoletin dan alkaloid (Ariel *et al.*, 2021).

2.3.3.1 Eponymicin

Eponemycin merupakan salah satu golongan peptida epoksiketon yang memiliki aktivitas anti tumor melalui penghambatan fungsi proteasome dan selanjutnya mengganggu kerja sistem ubiquitin-proteasome. Penghambatan fungsi proteasome menyebabkan perubahan morfologi sel dan berakhir pada apoptosis. Mekanisme kerja yang mempengaruhi proteasome ini kemudian menjadi target terapi antimalaria (Fitri *et al.*, 2019).

Mekanisme kerja eponemycin sebagai antimalaria dari metabolit ekstrak *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* dapat mengganggu kerja sistem ubiquitin-proteasome parasit sehingga terjadi stres dan kematian *P. berghei* secara *in vivo* (Fitri *et al.*, 2019; Rivo *et al.*, 2013). Penghambatan proteasome yang dikenal luas di situs katalitik mengarah pada penghentian siklus sel dan aktivasi jalur apoptosis.

Hal ini terjadi dalam tahap trofozoit dan skizon *P. falciparum*, subunit proteasome 5 dari proteasome inti terbukti hadir dalam sitoplasma dan nukleus parasit stadium



darah. Mempertimbangkan replikasi DNA yang cepat selama tahap trofozoit eritrositik di mana terdapat peningkatan regulasi yang berbeda dalam ekspresi pada tahap trofozoit pertengahan/akhir hingga tahap skizon awal yang bertepatan dengan masa replikasi aktif. Analisis transkriptom juga menunjukkan bahwa selama transformasi tahap trofozoit menjadi skizon, terjadi peningkatan regulasi gen degradasi proteosomal di mana-mana yang menandai jalur pentingnya dalam *Plasmodium*. Oleh karena itu, ubiquitin-proteasome (UPS) adalah situs target potensial terapi antimalaria (Fitri *et al.*, 2019).

2.3.3.2 Isoquinolone

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* mengandung salah satu turunan dari isoquinoline. Studi molekuler dari golongan senyawa ini mengungkapkan bahwa golongan senyawa ini memiliki kriteria kemiripan obat berdasarkan aturan lima Lipinski, dan dengan demikian, dapat diberikan melalui rute oral dan memiliki aktivitas antimalaria yang dinilai dengan kekuatan pengikatan di setiap target protein dibandingkan dengan setiap ligan asli menggunakan pendekatan *reverse molecular docking*. Berdasarkan hasil penelitian, golongan senyawa baru ini dapat diformulasikan sebagai kandidat obat antimalaria (Nugraha *et al.*, 2020).

Mekanisme aksi yang paling mungkin isoquinolone sebagai anti malaria adalah melalui interaksi senyawa dengan beberapa protein kunci sesuai dengan afinitas pengikatannya, antara lain yaitu adenylosuccinate sintetase, falcipain 2, glukosa-6-fosfat isomerase, enoyl-acyl carrier protein reductase, gliserol kinase, dan dihidrofolat reduktase-timidilat sintase. Turunan isoquinoline memiliki potensi mengikat setiap protein target sehingga menghambat afinitas ikatannya (Nugraha *et al.*, 2020).



2.3.3.3 Tryptanthrin

Tryptanthrin adalah produk alami yang telah dilaporkan memiliki beberapa khasiat obat. Tryptanthrin merupakan golongan senyawa alkaloid lemah dan memiliki berat molekul 248,24 g / mol (Tucker & Grundt, 2012). Tryptanthrin merupakan produk alam yang menunjukkan aktivitas biologis yang signifikan sebagai agen antibakteri, antiparasit, dan antineoplastik. Secara historis, tryptanthrin telah ditemukan sebagai komponen dari banyak pewarna serta konstituen pengobatan herbal. Selain itu, produk alami triptantrin dikenal dengan aktivitasnya yang luas, termasuk aktivitas antiplasmodial (Onambele *et al.*, 2015; Pathania *et al.*, 2014).



Gambar 2. 9 Rumus Golongan Senyawa Kimia Tryptanthrin. Tryptanthrin berwarna kuning cerah, terdiri dari cincin quinazoline yang melekat pada bagian indolen dari gugus karbonil pada posisi 6 dan 12 (Tucker & Grundt, 2012)

Tryptanthrin telah diisolasi dari berbagai sumber alami. Secara khusus, tryptanthrin ditemukan dalam bahan tumbuhan yang secara tradisional digunakan sebagai pewarna termasuk woad Cina (*Isatis tinctoria*), nila Jepang (*Polygonum tinctorium*), Assam nila (*Strobilanthes cusia*), Nila naturalis (*Strobilanthes formosanus*), dan pewarna oleander (*Wrightia tinctoria*). Selanjutnya triptantrin juga telah diisolasi dari buah pohon cannonball (*Couroupita guianensis*), anggrek *Phaius mishmensis* dan *Calanthe discolor*, jamur *Schizophyllum commune* dan *Leucopaxillus serealis*, serta strain bakteri genus *Cytophaga*. Triptantrin juga ditemukan pada mamalia, khususnya dalam urin gajah Asia (*Elephas maximus*) dan cairan kantung sayap kelelawar *Saccopteryx bilineata* (Tucker & Grundt, 2012).



Triptantrin juga telah diidentifikasi sebagai golongan senyawa aktif dari obat herbal tradisional Jepang yang digunakan untuk mengobati infeksi jamur.

Kemudian tryptantrin dan turunannya juga diketahui memiliki aktivitas antibakteri, terutama terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, dan aktivitas melawan parasit protozoa *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, dan *Toxoplasma gondii* (Onambele *et al.*, 2015).

Pada penelitian sebelumnya, fraksi nomor 41 dan 44 dari ekstrak *Streptomyces hygroscopicus* telah terbukti secara *in vivo* maupun secara *in silico* memiliki kandungan triptantrin yang mempunyai afinitas pengikatan kuat dengan protein target *Plasmodium falciparum* Aminopeptidase M1 (PfA-M1), Falcipain 2 Protease, dan *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT) sehingga dipercaya memiliki efek antimalaria (Fitri, *et al.*, 2021).

2.3.3.4 Terpene

Terpen adalah bagian dari kelompok produk terbesar tanaman yang aktif secara biologis. Terpen secara kimia diklasifikasikan berdasarkan jumlah subunit isoprena, $[C_5H_8]_n$ [dengan n = jumlah unit isoprena]. Oleh karena itu golongan ini terdiri dari hemiterpen $[C_5]$, monoterpen $[C_{10}]$, seskuiterpen $[C_{15}]$, diterpen $[C_{20}]$, sesterpen $[C_{25}]$, triterpen $[C_{30}]$, tetra-terpen $[C_{40}]$ dan politerpen $[C_n]$. Laporan telah menunjukkan bahwa meskipun terpen tersebar luas di kingdom tumbuhan, sebagian besar golongan senyawa bioaktif ini telah ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi (Hill & Connolly, 2015; Putta *et al.*, 2016).

Triterpen tersebar luas di kerajaan tumbuhan dan hewan laut, dan mereka ditemukan baik dalam keadaan bebas, sebagai ester, atau sebagai glikosida [saponin]. Triterpen terdiri dari enam unit isoprena $[C_5H_8]_6$ dari asam mevanolic atau deoxyxylulose phosphate, dan diturunkan dari penggabungan reduktif dua molekul farnesyl pyrophosphate oleh squalene synthase. Beberapa contoh terpenoid terisolasi adalah turunan squalene, lanostanes, holostanes,



cycloartanes, cucurbitanes, dammaranes, euphanes, tirucallanes, tetranortriterpenoids, quassinoids, lupanes, oleananes, friedelanones, ursanes, hopanes, serratanes (Hill & Connolly, 2015; Putta *et al.*, 2016).

Plasmodium sp. memiliki organel, apicoplast, yang penting untuk perkembangan parasit karena terkait dengan dua jalur metabolisme, salah satunya adalah biosintesis isoprenoid yang berbeda dalam beberapa langkah dari jalur isoprenoid pada inang vertebrata. Apicoplast, organel yang berasal dari asal endosimbiosis sekunder alga merah, telah kehilangan fungsi fotosintesisnya selama evolusi, dan spekulasi telah menunjukkan pentingnya dalam pembentukan komponen penting yang tergabung ke dalam membran vakuola parasitofor. Baru-baru ini, telah ditunjukkan bahwa biosintesis isoprenoid tidak hanya penting untuk parasit tetapi, pada kenyataannya merupakan satu-satunya fungsi apicoplast selama pertumbuhan tahap darah dan bentuk seksual. Jalur biosintesis merupakan target penting untuk mengevaluasi obat antimalaria baru dan terpen yang berasal dari jalur isoprenoid dan memiliki struktur yang serupa dapat mengganggu sintesis isoprenoid serta harus dievaluasi sebagai potensi antimalaria (Gabriel *et al.*, 2018).

Bahan kimia terpenoid dan turunannya memiliki struktur yang dapat melewati lipid bilayer membran eritrosit dan menghambat sintesis protein pada sel parasit (Clarkson *et al.*, 2004). Bentuk membran eritrosit berubah menjadi stomatosit atau ekinosit tergantung pada kemampuan ikatan hidrogennya; kedua jenis perubahan eritrosit tersebut dapat menginvasi dan menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* (Clarkson *et al.*, 2004). Terpene dapat mencegah sintase isoprenil difosfat dari kondensasi molekul IPP dan substrat isoprenik lainnya menjadi rantai isoprena, mencegah parasit menghasilkan biomolekul poliisoprenoid (Ziegler *et al.*, 2004). Terpene juga dapat bersaing dengan sejumlah enzim yang memanfaatkan senyawa isoprenik sebagai substrat,



mencegah produksi senyawa isoprenoid, seperti rantai isoprenik dari cincin benzokuinon ubikuinon pada tahap skizon (Gabriel *et al.*, 2018; Ziegler *et al.*, 2004).

2.3.3.5 Coumarin

Coumarin adalah golongan senyawa serbaguna karena coumarin beserta turunannya menunjukkan aktivitas biologis yang sangat besar seperti antikanker, antimalaria, antimikroba, dan antiinflamasi (Kaushik & Chahal, 2021). Daphnetin atau 7,8-dihidroksikoumarin sebagai salah satu senyawa turunan coumarin dapat menghambat aktivitas *P. falciparum* secara *in vitro* dengan mencegah sintesis DNA (Moon *et al.*, 2011). Penghambatan dalam proses sintesis DNA dapat menghambat replikasi parasit, yang menyebabkan parasit mati karena kekurangan protein penting untuk fungsi metabolisme parasit (Goulart *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2011). Daphnetin dapat mensupresi sintesis DNA pada tahap trophozoit selama fase perkembangan *P. falciparum* (Moon *et al.*, 2011). Salah satu turunan coumarin yaitu scopoletin (Susidarti, 2014), adalah salah satu kandungan senyawa fraksi 36K. Namun, scopoletin (7-hidroksi,6-metoksikoumarin) tampaknya tidak memiliki aktivitas antiplasmodial *in vitro* karena tidak adanya gugus hidroksil pada posisi C-8 (Yang *et al.*, 1992).

2.4 Uji Toksisitas

Pengujian toksisitas senyawa baru sangat penting untuk proses pengembangan obat. Pengujian toksisitas praklinis pada berbagai sistem biologis mengungkapkan efek toksik spesifik spesies, organ, dan dosis dari produk yang diteliti. Toksisitas zat dapat diamati dengan (a) mempelajari paparan yang tidak disengaja terhadap suatu zat (b) studi *in vitro* menggunakan sel atau *cell lines* (c) paparan *in vivo* pada hewan percobaan (Parasuraman, 2011).



Toksitas dapat dievaluasi secara kualitatif atau kuantitatif. Analisis kualitatif memberikan informasi tentang sifat toxin, tetapi analisis kuantitatif memberikan informasi tentang zat kimia toxin dan konsentrasinya. Analisis instrumental nonspesifik seperti analisis kolorimetri dan *UV-visible spectrophotometric* tampak dapat digunakan untuk analisis kualitatif toxin. Sedangkan analisis kuantitatif biasa dilakukan dengan *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), *gas chromatography*, *infrared spectroscopy* dan teknik immunoassay yang dapat digunakan untuk mengukur toxin (Parasuraman, 2011).

Pengujian toksitas akut dilakukan pada spesies hewan tertentu untuk mengetahui pengaruh dosis tunggal secara *in vivo*. Produk yang akan diteliti diberi perlakuan dengan pemberian dosis dengan tingkat yang berbeda pada pengujian toksikologi akut, kemudian diamati efeknya selama 14 hari. Selama periode percobaan, semua kematian akibat produk atau senyawa diteliti dan diamati perubahan morfologi, patologis, biokimia, dan histologisnya pada hewan yang mati. Pengujian toksitas akut memungkinkan dosis mematikan atau *lethal concentration* 50% (LC_{50}) dari produk yang diteliti dapat ditentukan. LC_{50} digunakan sebagai indikator toksitas akut sebelumnya. Penentuan LC_{50} melibatkan sejumlah besar hewan, dan rasio kematiannya tinggi (Parasuraman, 2011).

2.4.1 MTT assay

Uji Microtetrazolium (MTT) dalam aktivitas metabolisme seluler banyak dilakukan untuk mempelajari toksitas pengobatan, viabilitas sel, dan aktivitas metabolik. Pada uji ini menggunakan reagen MTT yang terdiri dari inti cincin tetrazole kuartener bermuatan positif yang mengandung empat atom nitrogen dan dikelilingi oleh tiga cincin aromatik termasuk dua gugus fenil serta satu cincin tiazolil. Pengurangan dari MTT menyebabkan gangguan pada inti cincin tetrazole

dan pembentukan suatu molekul yang tidak larut air berwarna violet kebiruan yang disebut formazan (Berridge *et al.*, 2005; Ghasemi *et al.*, 2021).

Reagen MTT dapat melewati membran sel serta membran dalam mitokondria dari sel yang layak mungkin karena muatan positifnya serta struktur lipofiliknya dan direduksi menjadi formazan oleh sel yang aktif secara metabolik (Berridge *et al.*, 2005; Stockert *et al.*, 2018). Pengujian MTT memiliki kegunaan yang luas sebagai pengujian aktivitas metabolisme sel dan kini semakin banyak diterapkan untuk menyimpulkan proses sekunder atau keadaan sel, seperti viabilitas. Uji MTT biasanya dilakukan setelah beberapa jam inkubasi sel dengan reagen MTT. Formazan yang tidak larut dalam air yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan pelarut seperti Dimethyl sulfoxide (DMSO). Selanjutnya, penurunan transmisi cahaya dengan absorbansi dan mekanisme lain oleh larutan MTT-formazan yang dihomogenkan diukur menggunakan *microplate reader* dalam *optical density* (OD) pada panjang gelombang yang paling banyak diserap oleh formazan turunan MTT (sekitar 570 nm). Nilai OD yang diukur diasumsikan sebagai representasi konsentrasi formazan dan akibat dari pengurangan MTT intraseluler. Hal ini menjadi dasar penerapan uji MTT sebagai alat umum untuk mengukur proliferasi/viabilitas sel, sitotoksitas obat, dan aktivitas sel mitokondria/metabolic (Ghasemi *et al.*, 2021; Stockert *et al.*, 2018).

2.4.2 Kultur Sel

Kultur sel dapat digunakan untuk menyaring toksisitas baik dengan estimasi fungsi basal sel (yaitu proses yang umum untuk semua jenis sel) atau dengan tes pada fungsi sel khusus. Uji toksisitas umum, yang ditujukan terutama untuk mendeteksi aktivitas biologis zat uji, dapat dilakukan pada banyak jenis sel (misalnya sel fibroblas, HeLa dan hepatoma). Uji toksisitas menggunakan sel khusus telah terbukti paling berguna, melalui penyelidikan *in vitro* menggunakan



kultur sel khusus telah digunakan untuk memperjelas mekanisme aksi toksik pada jaringan target (Ekwall *et al.*, 1990).

Dibandingkan dengan sel-sel dari jaringan dewasa normal, sel embrio dan sel tumor lebih mudah dikultur karena memiliki kemampuan pertumbuhan yang lebih tinggi dan lebih mudah beradaptasi dengan variasi faktor eksternal. Pengaturan kultur sel primer dan *cell line* memperlihatkan beberapa hilangnya diferensiasi, tetapi ada banyak jenis sel yang menampilkan aktivitas biologis yang sangat terspesialisasi secara *in vitro* yang merupakan karakteristik jaringan atau organ aslinya (Ekwall *et al.*, 1990).

2.4.3 Breast Cancer Cell Line

Sel kanker adalah sel yang spesial karena mengalami regresi ke tahap yang jauh lebih sederhana, lebih primitive, tidak seperti induk normal, dan membelah terus menerus meskipun tidak efisien. Akibat proporsi sel kanker yang jauh lebih tinggi mengalami pembelahan aktif, sel kanker lebih rentan terhadap obat anti-kanker daripada kebanyakan sel normal. Namun, jaringan normal dengan indeks mitosis tinggi (misalnya sumsum tulang, limpa, timus dan epitel usus) juga lebih rentan terhadap obat anti kanker. Baik pada jaringan normal maupun pada jaringan proliferasi neoplastik, toksisitas dari banyak obat tampaknya terkait dengan efek pada *mitotic spindle* dan replikasi DNA. Bahan kimia yang mampu menyerang langsung mikrotubulus atau *mitotic spindle* selektif untuk sel yang berproliferasi, tetapi jarang yang lebih selektif untuk jaringan tumor (Ekwall *et al.*, 1990).

Cell line tampaknya menjadi elemen kunci untuk diagnosis molekuler karena dapat digunakan secara luas dalam banyak aspek penelitian laboratorium dan khususnya, sebagai model *in vitro* dalam banyak model penelitian. Sel MCF-7 mewakili kandidat yang sangat penting dalam kanker payudara dan sering digunakan dalam banyak penelitian (COMŞA *et al.*, 2015). Beberapa penelitian



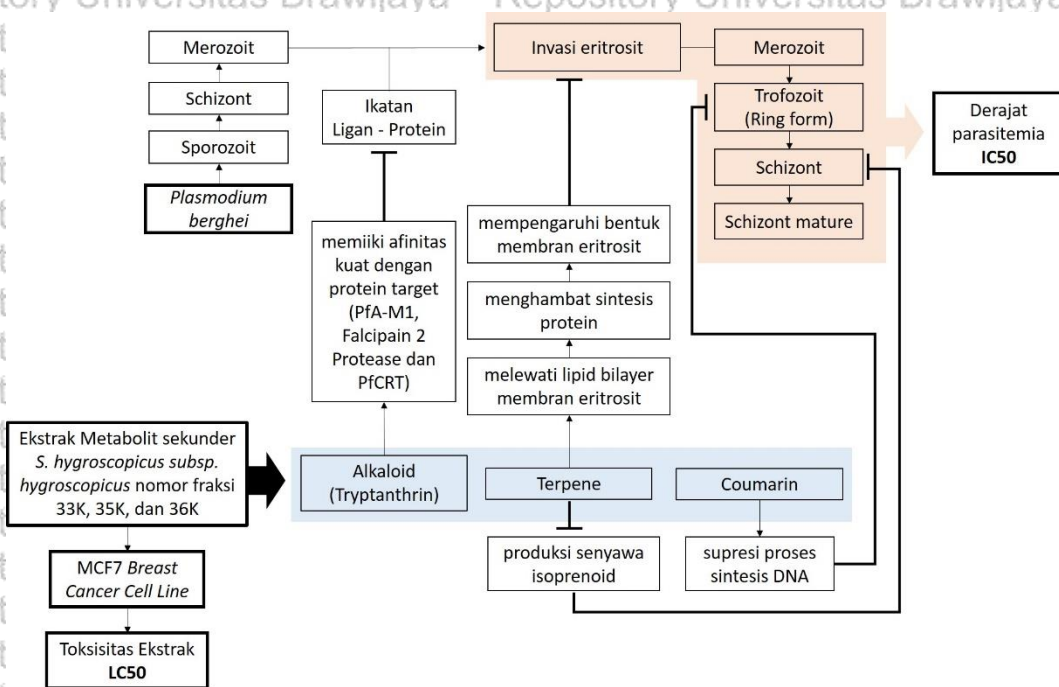
sebelumnya meneliti efek obat antimalaria yang dikombinasikan dengan obat kanker ataupun sebagai monoterapi pada MCF-7 (Duarte & Vale, 2020; Parasuraman, 2011; Suberu *et al.*, 2014) dan *cell line* kanker lainnya (Cahyono, *et al.*, 2020; Espindola *et al.*, 2022; Zin *et al.*, 2020). Selain itu, diyakini bahwa obat antimalaria memiliki efek sinergis dengan obat antikanker (Suberu *et al.*, 2014). Sel-sel kanker lebih rentan terhadap obat-obatan beracun daripada kebanyakan sel normal karena mereka secara aktif membelah dengan kecepatan yang jauh lebih besar, dan ini terkait dengan gelendong mitosis dan replikasi DNA dalam sel kanker (Lange *et al.*, 2011; Mabeta *et al.*, 2018).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- : Memicu/terdiri dari
- | : Menghambat
- (black) : Diteliti
- (white) : Tidak diteliti
- (orange) : Fase infeksi eritrosit
- (blue) : Metabolit sekunder

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Plasmodium berghei merupakan parasit protozoa yang menyebabkan malaria di beberapa rodent. *P. berghei* tidak menginfeksi langsung manusia akan tetapi *P. berghei* mempunyai beberapa keunggulan karena siklus hidup dan morfologi yang mirip dengan spesies *Plasmodium* lain yang menyebabkan malaria pada manusia, sehingga sering digunakan sebagai model penelitian infeksi malaria. Proses invasi eritrosit dimediasi oleh ikatan antara ligan dan protein target di permukaan sel eritrosit. Setelah invasi eritrosit, *P. berghei* mengalami siklus replikasi aseksual di dalam eritrosit, sehingga mereka berkembang dari merozoit



menjadi menjadi trofozoit dan kemudian menjadi skizon. Skizon dewasa akan ruptur untuk melepaskan merozoit untuk menginvasi eritrosit-eritrosit lainnya.

Ekstrak metabolit *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* terbukti memiliki memiliki beberapa kandungan golongan senyawa yaitu terpene, coumarin dan alkaloid (tryphantrin) yang memiliki khasiat sebagai antimalaria. Bahan kimia terpene dan turunannya memiliki struktur yang dapat melewati lipid bilayer membran eritrosit dan menghambat sintesis protein pada sel parasit. Bentuk membran eritrosit berubah menjadi stomatosit atau ekinosit tergantung pada kemampuan ikatan hidrogennya; kedua jenis perubahan eritrosit tersebut dapat menginvasi dan menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum*. Terpenes juga diketahui dapat mengganggu jalur sintesis isoprenoid dan mencegah parasit menghasilkan biomolekul poliisoprenoid. Terpene juga dapat bersaing dengan sejumlah enzim yang memanfaatkan senyawa isoprenik sebagai substrat, mencegah produksi senyawa isoprenoid, seperti rantai isoprenik dari cincin benzokuinon ubikuinon pada tahap skizon.

Selanjutnya turunan golongan senyawa coumarin yaitu daphetin dapat menghambat dalam proses sintesis DNA dan replikasi parasit sehingga parasit mati karena kekurangan protein penting untuk fungsi metabolisme parasit. Coumarin dapat mensupresi sintesis DNA pada tahap trofozoit selama fase perkembangan parasit. Selanjutnya alkaloid lemah yaitu triphantrin memiliki afinitas pengikatan kuat dengan protein target *Plasmodium falciparum* Aminopeptidase M1 (PfA-M1), Falcipain 2 Protease, dan *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT) sehingga dapat mengganggu ikatan ligan-protein antara merozoit dan eritrosit.

Pada penelitian ini akan mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* khususnya nomor fraksi 33K, 35K, dan 36K, evaluasi meliputi nilai IC_{50} dan LC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi ekstrak *S.*



hygroscopicus subsp. *hygroscopicus* yang dapat menghambat 50% densitas pertumbuhan kultur sel *P. berghei* serta menentukan LC₅₀ sebagai konsentrasi ekstrak *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* yang dapat membunuh 50% dari kultur sel MCF-7 pada MTT assay dan memiliki sifat yang non-toksik.

3.3 Hipotesis Penelitian

3.3.1 Hipotesis Umum

Fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* memiliki efek antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* dan bersifat tidak toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell line* sehingga memiliki potensi sebagai kandidat obat antimalaria potensial baru pada uji *in vitro*.

3.3.2 Hipotesis Khusus

1. Fraksi 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* memiliki nilai *Inhibition Concentration 50* (IC₅₀) yang mampu menghambat densitas pertumbuhan kultur *Plasmodium berghei* pada uji *in vitro*
2. Fraksi 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* mampu mengubah morfologi *P. berghei*
3. Fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* memiliki nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) dan bersifat non-toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* pada uji *in vitro*



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Seluruh kegiatan penelitian dilakukan dengan menerapkan desain eskperimental murni menggunakan uji *in vitro* di dalam laboratorium. Penelitian ini menggunakan *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* yang telah difermentasi dan diekstraksi oleh peneliti terdahulu Ariel *et al.*, (2021) untuk mendapatkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder aktif kemudian difraksinasi dan diperoleh total 47 fraksi pada fraksinasi pertama dan 60 fraksi pada fraksinasi kedua. Pada penelitian ini akan berfokus pada fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K. Terdapat dua uji yang akan dilakukan yaitu meliputi uji efektivitas dan uji toksisitas. Uji efektivitas dilakukan secara *in vitro* terhadap kultur *Plasmodium berghei* dengan parameter uji menggunakan densitas parasit dari hasil pengamatan morfologi parasit secara mikroskopis kemudian ditentukan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀). Sedangkan uji toksisitas menggunakan prosedur MTT Assay terhadap kultur MCF-7 *cell line*. Hasil uji toksisitas diukur menggunakan *microplate reader*, kemudian nilai persentase sel mati yang digunakan untuk menentukan *Lethal Concentration* 50 (LC₅₀) sebagai parameter uji toksisitas fraksi ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*. Penelitian ini telah lulus dalam uji etik yang dilakukan oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam No. 13/EC/KEPK/01/2022.

4.2 Sampel Penelitian

Isolat bakteri *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* sebagai sampel penelitian ini diterima dari koleksi mikroba Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Indonesia. Kemudian, bakteri dilakukan subkultur di



Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya menggunakan media kultur *International Streptomyces Project 4 (ISP4)*. Bakteri dikarakterisasi secara makroskopik untuk morfologi koloninya dan secara mikroskopis untuk morfologi spesifiknya berdasarkan pewarnaan Gram.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Besar konsentrasi fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak senyawa metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus subsp. Hygroscopicus* merupakan variabel bebas penelitian ini.

4.3.2 Variabel Terikat

Persentase penghambatan densitas parasit dan perubahan morfologi parasit *P. berghei* yang diamati menggunakan mikroskop cahaya pada uji efektivitas dan persentase nilai kematian sel menggunakan MTT assay pada uji toksisitas merupakan variabel terikat penelitian ini.

4.4 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Nama	Definisi operasional
Fraksi metabolit sekunder <i>Streptomyces hygroscopicus subsp. Hygroscopicus</i>	Fraksi metabolit sekunder <i>Streptomyces hygroscopicus</i> yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil fraksinasi ekstrak metabolit sekunder <i>Streptomyces hygroscopicus subsp. Hygroscopicus</i> pada penelitian sebelumnya dari dengan metode kromatografi kolom menggunakan alat BUCHI Reveleris® PREP Purification System dengan nomor fraksi 33K, 35K, dan 36K. Konsentrasi yang digunakan untuk uji efektivitas adalah 0.25 µg/ml, 1.25 µg/ml, 6.25 µg/ml, 31.25 µg/ml, dan 156.25 µg/ml. Sedangkan konsentrasi yang digunakan untuk uji toksisitas 0.25 µg/ml, 2.5 µg/ml, 25 µg/ml, 250 µg/ml, dan 2500 µg/ml. Penentuan besar konsentrasi dilakukan berdasarkan penelitian pendahuluan yang belum diterbitkan (Fitri <i>et al</i> , unpublished, 2022)
Kultur <i>P. berghei</i>	Isolat <i>P. berghei</i> dengan berbagai stadium pertumbuhan yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Klinik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, yang diperoleh dari hasil inokulasi pada 6 ekor mencit terlebih dahulu.



Kultur sel MCF-7	Kultur sel MCF-7 merupakan kultur sel kanker payudara yang diterima dari <i>American Type Culture Collection</i> (HTB-22-ATCC) (Bioresource Center, Manassas, VA, USA).
<i>Inhibitory Concentration</i> 50 (IC ₅₀)	IC ₅₀ adalah konsentrasi ekstrak <i>S. hygroscopicus subsp. hygroscopicus</i> yang dapat menghambat 50% densitas pertumbuhan kultur sel <i>P. berghei</i> yang diukur berdasarkan analisis probit hasil densitas parasit. Data yang diperoleh akan dihitung menggunakan SPSS versi 23. IC ₅₀ termasuk pengukuran secara kuantitatif dengan satuan ukur persen (%).
Uji Efektivitas	Uji efektivitas yang dilakukan adalah untuk menentukan efektivitas kerja penghambatan densitas parasit oleh fraksi 33K, 35K, dan 36K metabolit sekunder <i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>Hygroscopicus</i> ekstrak yang dengan konsentrasi terendah namun dapat memberi hasil yang maksimal. Uji efektivitas dinilai menggunakan perhitungan IC ₅₀ .
<i>Lethal Concentration</i> (LC ₅₀)	LC ₅₀ adalah konsentrasi ekstrak <i>S. hygroscopicus subsp. hygroscopicus</i> yang dapat membunuh 50% kultur sel MCF-7 pada MTT assay. Data yang diperoleh akan dihitung menggunakan SPSS versi 23. LC ₅₀ termasuk pengukuran secara kuantitatif dengan satuan ukur persen (%).
Uji Toksisitas	Uji toksisitas yang dilakukan adalah untuk menentukan tingkat kemanan diantara terbaik dari fraksi 33K, 35K, dan 36K metabolit sekunder <i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>Hygroscopicus</i> ekstrak yang dengan konsentrasi tertinggi tetap tidak menimbulkan efek toksik terhadap sel manusia. Uji toksisitas dinilai menggunakan perhitungan LC ₅₀ menggunakan MTT assay.
MTT assay	MTT Assay merupakan uji kolorimetri untuk mengetahui viabilitas sel menggunakan dalam uji sitotoksitas dengan prinsip reduksi garam kuning tetrazolium MTT dengan sistem reduktase. Prosedur MTT assay dilaksanakan dengan cara mengukur data dengan panjang gelombang 520 nm pada alat <i>Microplate reader</i> . Pemeriksaan ini menyajikan data secara kuantitatif dengan satuan ukur <i>Optical Density</i> (OD).

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Lokasi tempat dilakukan penelitian ini yaitu di Laboratorium Parasitologi

Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pelaksanaan penelitian ini dalam rentang waktu Februari hingga November 2022.



4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Uji Efektivitas Fraksi Ekstrak Metabolit Sekunder *Streptomyces hygroscopicus*

Alat yang digunakan untuk uji efektivitas adalah *well plate*, inkubator, kaca objek, pipet, *well microplate* 48, *blue tip*, *yellow tip* dan mikroskop cahaya.

Sedangkan bahan yang digunakan adalah media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), Dimetil sulfoksida (DMSO) 1%, artemisinin, fraksi metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*, pewarnaan giemsa. Model donor hewan untuk kultur awal sebelum dilakukan uji efektivitas pada uji *in vitro* menggunakan mencit albino Balb/c jantan, berat \pm 20-25 gram, berusia 6-8 minggu. Mencit diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.6.2 Uji Toksisitas pada Kultur MCF-7 Cell Line

Alat yang digunakan untuk uji toksisitas sentrifugator, falcon, *well microplate* 96, inkubator CO₂, *microplate reader*, mikropipet, *blue tip* dan *yellow tip*. Bahan yang digunakan untuk uji toksisitas adalah kultur sel MCF7, larutan ekstrak *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*, *Medium Complete* (MC) pertumbuhan sel MCF7 yang terdiri dari RPMI 1640, *deionized water*, NACHO₃, HEPES, antibiotik penisilin, dan streptomycin, *Fetal Bovine Serum* (FBS), dan media cryo, 5-10% larutan DMSO. Bahan lain yang diperlukan adalah *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan Tripsin-EDTA 0.25%, dan reagen MTT.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Fraksinasi Ekstrak Metabolit Sekunder Bakteri *Streptomyces hygroscopicus*

Proses fraksinasi hasil fermentasi ekstrak *S. hygroscopicus* dilakukan dengan panjang gelombang dan pelarut tertentu pada kolom kromatografi BUCHI



Reveleris® PREP *Purification System*. Pertama, langkah yang dilakukan yaitu injektor dibersihkan menggunakan etil asetat tanpa kolom. Sembari membersihkan kolom dilakukan preparasi kolom dengan cara kering. Kemudian silika gel 60 dilakukan penimbangan untuk preparasi kolom dan diletakkan di dalam kolom, selanjutnya dimampatkan dengan cara vacum. Kemudian menyiapkan mesin kromatografi BUCHI Reveleris® PREP dan meletakkan kolom tersebut.

Selanjutnya etil asetat digunakan untuk mengkondisikan hingga semua kolom siap digunakan dan silika sudah terbasahi, yang selanjutnya dilakukan pengaturan metode running. Pengaturan running meliputi *flowrate* 5 ml/menit, urutan tabung penampung, gradient eluen dengan pengaturan *gradient mode* selama 120 menit dari nheksan 100% hingga etil asetat 100%, kemudian menggunakan *isocratic mode* selama 10 menit etil asetat 100% untuk mengganti n-heksan dengan metanol p.a. Penggantian n-heksan dengan metanol ini bertujuan agar senyawa yang tertinggal atau tersangkut terbilas dengan baik. *Gradient mode* metanol 100% - 0% dilakukan dengan *flowrate* 5 ml/menit selama 30 menit. Apabila pengaturan *running* selesai, dilanjutkan dengan menambahkan 1 mL methanol dan ekstrak hingga larut, kemudian diinjeksikan ke injektor menggunakan spuit yang telah di beri kertas saring. Sampel yang ditampung pada proses *running* dilanjutkan dengan proses penguapan pada lemari asam menghilangkan *eluent* yang tertampung selama proses *running*. Proses terakhir adalah menimbang fraksi yang telah selesai dikeringkan tersebut.

4.7.2 Uji Efektivitas Fraksi 33K, 35K, dan 36K Metabolit Sekunder Bakteri *Streptomyces hygroscopicus*

4.7.2.1 Persiapan Uji Efektivitas

Persiapan uji coba dilakukan menggunakan fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K hasil fraksinasi dengan *Purification System Flash Column*. Kemudian menyiapkan pelet eritrosit beku yang telah terinfeksi oleh *P. berghei* dan dilakukan



thawing serta sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Kemudian pelet tersebut dicuci dua kali menggunakan media RPMI. Kemudian pelet tersebut diencerkan sesuai dengan kebutuhan inokulasi kepada mencit (Nugraha *et al.*, 2013).

4.7.2.2 Pemiakan parasit *Plasmodium berghei* secara *in vitro*

Hewan donor pada penelitian ini menggunakan mencit albino jantan galur Balb/c, berusia 6-8 minggu, dan dengan berat badan rata-rata 20 gram. Mencit tersebut didapatkan dari Laboratorium Hewan Coba Universitas Brawijaya, Malang. Mencit donor dipelihara di Laboratorium Parasitologi di dalam kandang dan diberikan pakan standar satu kali sehari. Mencit donor diberi minum air matang yang diganti setiap hari. Selama pemeliharaan, mencit donor diperlakukan sesuai dengan etik hewan coba.

Pertama, *P. berghei* diinokulasi dengan cara injeksi intraperitoneal pada mencit. Selanjutnya dilakukan pengamatan densitas parasit pada mencit dilakukan setiap 2 hari menggunakan hapusan darah yang didapatkan dari ekor mencit dengan asumsi bahwa terjadi peningkatan densitas parasit dua kali lipat pada hapusan darah. Setelah densitas parasit mencapai minimal 5%, darah mencit diambil seluruhnya melalui jantung mencit dan dilakukan kultur dalam 24 *well plate* (Fitri *et al.*, unpublished, 2022). Kemudian, kultur pada *microplate* dibagi menjadi tujuh kelompok meliputi jumlah kelompok perlakuan dari fraksi 33K, 35K dan 36K metabolit sekunder bakteri *S. hygrosopicus* dan kelompok kontrol positif yang diberikan paparan 2 μ L artemisinin 0,1 mM serta kelompok kontrol negatif menggunakan 2 μ L DMSO 1%.

4.7.2.3 Uji Efektivitas Antimalaria Ekstrak

Uji efektivitas antimalaria diamati melalui persentase inhibisi terhadap densitas *P. berghei*. Kelompok kultur *P. berghei* dipapar dengan konsentrasi 0.25 μ g/ml (1), 1.25 μ g/ml (2), 6.25 μ g/ml (3), 31.25 μ g/ml (4), dan 156.25 μ g/ml (5) dari

tiap fraksi lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 32°C dengan keadaan CO₂ 5%. Selanjutnya, kultur diambil dan dilakukan sentrifugasi. Pelet dari kultur tersebut digunakan untuk membuat hapusan darah pada gelas benda. Dilakukan pewarnaan giemsa sebelum dilakukan pengamatan pada mikroskop dengan perbesaran 100x untuk menghitung eritrosit yang terinfeksi dalam 5.000 eritrosit. Pada pengamatan dilihat morfologi parasit dan dihitung persentase densitas parasit pada setiap lapang pandang menggunakan rumus sebagai berikut (Pudjiastuti *et al.*, 2015; Fitri *et al.*, unpublished, 2022).

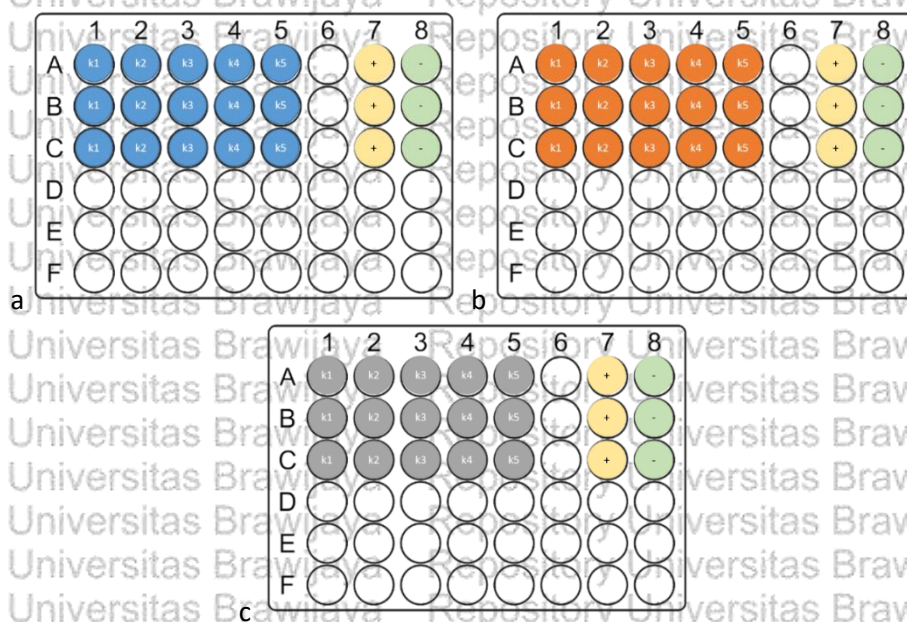
$$\text{Persentase Densitas Parasit} = \frac{\text{Jumlah eritrosit yang terinfeksi}}{\text{Total eritrosit}} \times 100\%$$

Kemudian, dilakukan perhitungan untuk menentukan persentase penghambatan densitas parasit menggunakan rumus berikut.

$$\text{Persentase Penghambatan} = 100\% - \left(\frac{\text{Persen densitas parasit perlakuan}}{\text{Persen densitas parasit } K(-)} \times 100\% \right)$$

Berdasarkan data penghambatan dari setiap konsentrasi ekstrak, lalu dihitung nilai IC₅₀ (konsentrasi ekstrak yang menghambat densitas pertumbuhan *Plasmodium* sebesar 50%) menggunakan analisis probit pada SPSS.

4.7.2.4 Denah 48 Well Microplate Uji Efektivitas



Gambar 4. 1 Denah Uji Efektivitas Fraksi Nomor 33K (a), 35K (b) dan 36K (c)



Keterangan:

K1 : Konsentrasi 0.25 µg/ml

K2 : Konsentrasi 1.25 µg/ml

K3 : Konsentrasi 6.25 µg/ml

K4 : Konsentrasi 31.25 µg/ml

K5 : Konsentrasi 156.25 µg/ml

+ : Kontrol Positif (0,1 mM Artemisinin)

- : Kontrol Negatif (DMSO 1%)

4.7.3 Uji Toksisitas menggunakan MTT Assay

4.7.3.1 Pembuatan Media Kultur

Langkah pertama pembuatan media kultur dengan menyiapkan 1 L *deionized water* dan melarutkan 1 *sachet* RPMI 1640 kedalamnya. Selanjutnya 2,4 gram HEPES, 2 gram NaCHO_3 , serta 100µl/ml streptomycin dan 100 UI/ml penicilin ditambahkan dan *diadjust* pada pH 7,2–7,4 untuk menghasilkan 1 L *serum free-media* (SF-M). Kemudian dengan filter 0,2 µm, media disaring dan disterilkan didalam LAF. Selanjutnya menyiapkan 10-20 ml *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan ditambahkan ke 100ml SF-M untuk membuat *medium Complete* (MC).

Kemudian dapat ditambahkan DMSO 5-10% ke dalam larutan MC untuk pembuatan 1 ml media *cryo*.

4.7.3.2 Pembuatan Media Kultur dan *Thawing* Sel

Media kultur untuk proses *thawing* dibuat dengan menambahkan Penisilin-Streptomycin 1%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan agar media kultur bersifat basa (NaCHO_3 1,5%) kedalam media RPMI 1640. Selanjutnya mengeluarkan sel MCF-7 dari *cryotube* dan menambahkan 4 mL media RPMI kemudian di sentrifugasi selama 8 menit pada kecepatan 800 rpm. Kemudian 4 mL media RPMI ditambahkan pada supernatan sel MCF-7 dan disentrifugasi kembali. Kemudian menyiapkan *flask* yang sudah berisi media RPMI 1640 dan antibiotik Penisilin-Streptomycin dan ditambahkan supernatan sel MCF-7. *Flask* dipindahkan dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator. Setiap 2-3 hari media kultur diganti dan diamati kepadatan jumlah selnya hingga 70-80% dalam satu *flask*.



4.7.3.3 Pengembangan/Sub Kultivasi Sel

Flask kultur yang berisi sel MCF-7 diamati menggunakan mikroskop inverted. Apabila sel telah konfluen dan melekat 80-90% maka dapat dimulai proses subkultur. Pertama, *flask* dikeluarkan dari inkubator dan diletakkan di LAF dilanjutkan membuang semua media sisa inkubasi. Kemudian *flask* dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS. Tripsin-EDTA sebanyak 1,5-2 ml ditambahkan ke dalam *flask*, kemudian *flask* diinkubasi selama 5-8 menit dalam inkubator. Apabila semua sel telah mengalami *detachment*, *flask* diberi tambahan MC sebanyak 5 ml dan semua larutan didalam *flask* dipindahkan ke dalam tabung falcon. Tabung falcon dimasukkan ke sentrifus dan diputar selama 10 menit dengan kecepatan 800x. Kemudian, pelet hasil sentrifus dilakukan suspensi dengan MC 1 ml setelah supernatan dibuang terlebih dahulu. Sel ditanam sesuai dengan kebutuhan dan sisa sel dimasukkan dalam inkubator CO2 5% pada suhu 37°C.

4.7.3.4 Pemeliharaan terhadap kultur sel kanker

Pemanenan sel dilakukan pertama dengan membuang media kultur terlebih dahulu, dilanjutkan dengan pencucian sel menggunakan PBS sebanyak ± 5 ml kemudian dihomogenkan dan dibuang. 0,25% Tripsin-EDTA sebanyak 1 ml ditambahkan secara merata ke dalam *flask* dan diinkubasi selama ± 3 menit. Setelah diinkubasi, ditambahkan sebanyak 5 ml media RPMI 10% untuk resuspensi sel dan mengaktifkan tripsin hingga sel terlepas.

4.7.3.5 Pemanenan Sel

Flask yang telah di resuspensi diamati dengan mikroskop inverted untuk melihat kondisi sel sebelum perlakuan pada perbesaran 100 µm. Apabila sel telah konfluen > 80% maka dilakukan pemanenan sel. Media SF dan MC yang disimpan sebelumnya pada lemari pendingin/freezer, didiamkan terlebih dahulu untuk menurunkan suhunya hingga sama dengan suhu ruang. *Flask* kultur dengan sel yang telah konfluen dimasukkan LAF dan media MC lama dibuang kedalam wadah



pembuangan. Kemudian *flask* ditambahkan 2 ml media SF dengan disaring menggunakan filter membran 0,22 μm . *Flask* kemudian dihomogenkan dengan cara mengoyang-goyangkannya sekaligus dapat membersihkan sel dari hasil metabolitnya dan media SF dibuang kedalam wadah pembuangan. Prosedur ini diulang sebanyak 2 kali. Selanjutnya memasukkan Tripsin-EDTA ke dalam *flask* dan disaring menggunakan filter membran 0,22 μm lalu dihomogenkan. *Flask* diletakkan dalam inkubator CO_2 $37^\circ\text{C} \pm 5\%$ dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah 5 menit, diamati kondisi sel apakah sel sudah terlepas dari dinding *flask*. Apabila sel telah terlepas, kemudian dilakukan teknik pipetting untuk meresusensikan sel dalam *flask* menggunakan *accu jet* dan pipet ukur agar sel tidak menggerombol. Kemudian memasukan MC ke dalam conical tube sebanyak 5 ml dan menambahkan sel dari *flask* lalu dihomogenkan. Semua dipindahkan ke dalam tabung falcon dan dilakukan sentrifugasi lagi. Setelah itu, supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan dengan pellet, lalu pellet dilakukan suspensi dengan teknik pipetting dan dimasukkan kedalam conical tube yang berisi 1ml MC hingga homogen.

4.7.3.6 Perhitungan Sel

Setelah proses pemanenan selesai, sebanyak 10 μl sel yang telah dipanen dimasukkan kedalam *micro tube* dan ditambahkan 10 μl tripan-blue kemudian dihomogenisasi. Selanjutnya 10 μl larutan dimasukkan kedalam hemasitometer. Jumlah sel hasil panen dihitung dengan counter dan mikroskop. Kemudian diamati apabila sel berwarna biru atau gelap mirip dengan *trypan blue* maka sel dianggap mati. Apabila diluar batas sebelah kanan dan atas ditemukan sel maka sel tersebut tidak dihitung sedangkan sel yang berada dibatas bawah dan kiri tetap dihitung.

Hasil perhitungan sel dalam 4 kamar (A, B, C, D) hemasitometer dijumlahkan menggunakan rumus berikut.



$$\text{Jumlah total sel} = \frac{\text{Total sel kamar A+B+C+D}}{4} \times 2 \times 10^4$$

Kemudian, dilakukan perhitungan untuk menentukan jumlah sel yang dibutuhkan dalam penanaman pada *microplate* 96 yang dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Volume kebutuhan sel} = \frac{\text{Total sel yang dibutuhkan}}{\text{Total sel terhitung/ml}}$$

4.7.3.7 *Platting* Sel

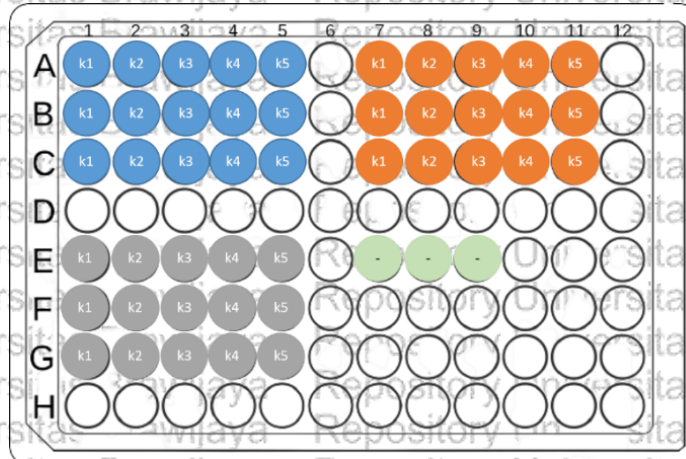
Sel hasil panen yang telah dihitung diencerkan hingga konsentrasi akhir dari sel yaitu 8×10^3 sel per 100 μl MC. Selanjutnya sel ditransfer ke *well microplate* 96 sebanyak 100 μl tiap sumur. Kontrol media dimasukkan pada 3 *well* lain yang kosong, kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop inverted untuk didokumentasikan dan melihat distribusi sel. Selanjutnya *microplate* diinkubasi selama \pm 24 jam dalam inkubator pada suhu $37^\circ\text{C} \pm \text{CO}_2$ 5%.

4.7.3.8 Pemaparan Ekstrak pada *Well Microplate*

Setelah 24 jam, suspensi sel dalam *well microplate* 96 dikeluarkan dari inkubator. Media lama dibuang dari 96 *wellplate* menggunakan spuit. Ekstrak metabolit sekunder *S. hygroscopicus subsp. Hygroscopicus* dengan 5 seri konsentrasi (0,25, 2,5, 25, 250, 2500 $\mu\text{g/ml}$) dimasukkan ke *well* yang masing-masing *well* telah terisis 100 μl sel dengan masing-masing tiga kali pengulangan. *Microplate* kemudian dihomogenkan dengan cara diketuk-ketuk secara perlahan. *Microplate* diletakkan selama 48 jam dalam inkubator.



4.7.3.9 Denah 96 Well Microplate



Gambar 4. 2 Denah Uji Toksisitas MTT Assay

Keterangan:

- K1 : Konsentrasi 0.25 µg/ml
- K2 : Konsentrasi 2.5 µg/ml
- K3 : Konsentrasi 25 µg/ml
- K4 : Konsentrasi 250 µg/ml
- K5 : Konsentrasi 2500 µg/ml

- : Kontrol Negatif (medium RPMI)
- (blue) : Fraksi nomor 33K
- (orange) : Fraksi nomor 35K
- (grey) : Fraksi nomor 36K

4.7.3.10 Penentuan LC₅₀ menggunakan Uji MTT

Pertama memasukkan dalam 15 ml *conical tube* larutan homogen 10 ml PBS dan serbuk MTT sebanyak 50 mg. Kemudian menggunakan filter membran

0,22 µm larutan disaring dan diambil 1 ml larutan stok MTT untuk dilarutkan dengan 9 ml media RPMI. Media dalam *wellplate* dibuang menggunakan spuit.

Masing-masing well ditambahkan sebanyak 100 µl larutan MTT dan diletakkan selama 3 jam dalam inkubator sampai terbentuk kristal violet-biru pada setiap well.

Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *interved*. Sel tampak berwarna violet-biru (formazan) yang menandakan sebagai sel yang hidup. Kemudian dapat

ditambahkan SDS 10% sebanyak 100 µL sebagai reagen *stopper* untuk menghentikan reaksi MTT, kemudian dibaca absorbansinya menggunakan

microplate reader. Sebelum dan setelah pemberian reagen sel hidup dan sel mati diamati menggunakan mikroskop *inverted*. Hasil pembacaan menggunakan

microplate reader didapatkan dalam satuan *optical density* (OD). Persentase sel



yang mati dihitung menggunakan persamaan rumus kemudian nilai LC₅₀ hasil uji MTT dihitung menggunakan analisis probit. Rumus menghitung persentase sel mati sebagai berikut.

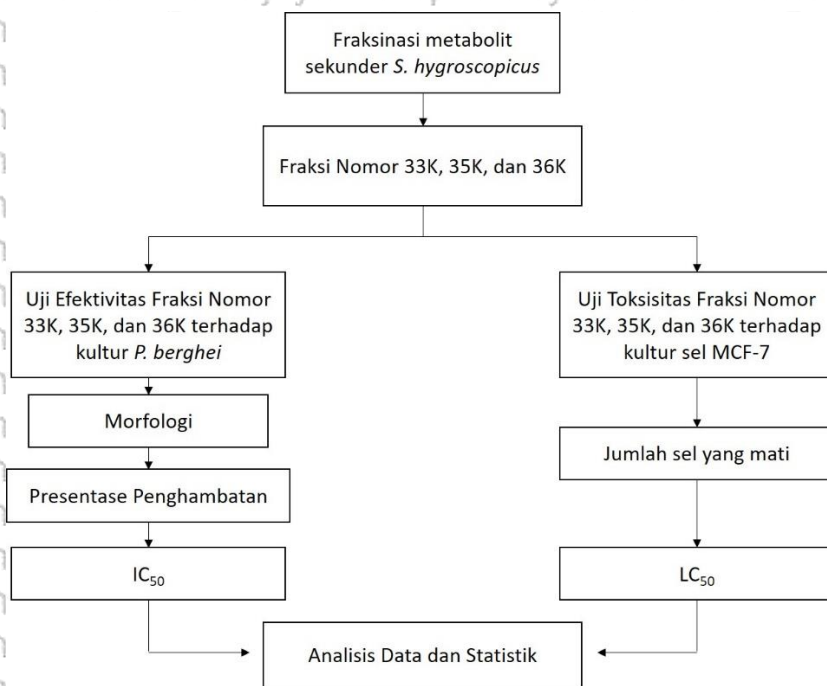
$$\% \text{ sel yang mati} = \frac{(\text{OD kontrol} - \text{OD perlakuan})}{(\text{OD kontrol})} \times 100\%$$

4.8 Analisis Statistik

Analisis statistik pada penelitian dihitung dengan IBM SPSS Statistics versi 26. Pertama data penelitian diuji normalitasnya menggunakan *Shapiro-wilk* (data sampel <50) untuk memastikan data tersebar normal atau tidak. Kedua diuji homogenitas data menggunakan *Lavene* untuk menentukan varian data sama (homogen) atau tidak. Nilai $p > 0,05$ menunjukkan distribusi data yang normal dan homogen. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok variabel penelitian diuji one way ANOVA. Kemudian dilakukan uji *Post hoc* dengan *Tukey HSD*. Data dapat diuji uji Kruskal-Wallis serta uji Mann-Whitney (data non parametrik) apabila data tidak memenuhi syarat normal dan homogen. Uji korelasi Pearson dan Spearman juga dilakukan untuk mengetahui korelasi konsentrasi ekstrak dengan data hasil penelitian. Kemudian dilanjutkan dengan uji regresi linier untuk menentukan arah hubungan variabel terikat dan variabel bebas. Seluruh uji statistik memiliki nilai $\alpha = 0,05$ atau derajat kepercayaan sebesar 95%.

Berdasarkan hasil efektivitas metabolit sekunder *S. hygroscopticus* subsp. *Hygroscopticus* terhadap kultur *P. berghei* mendapatkan data berupa densitas parasit. Hasil uji toksisitas metabolit sekunder *S. hygroscopticus* subsp. *Hygroscopticus* terhadap kultur sel MCF-7 mendapatkan data berupa persentase viabilitas sel. Kedua data hasil uji tersebut dilakukan analisis probit menggunakan SPSS untuk mencari nilai IC₅₀ dan LC₅₀ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

4.9 Bagan Alur Penelitian



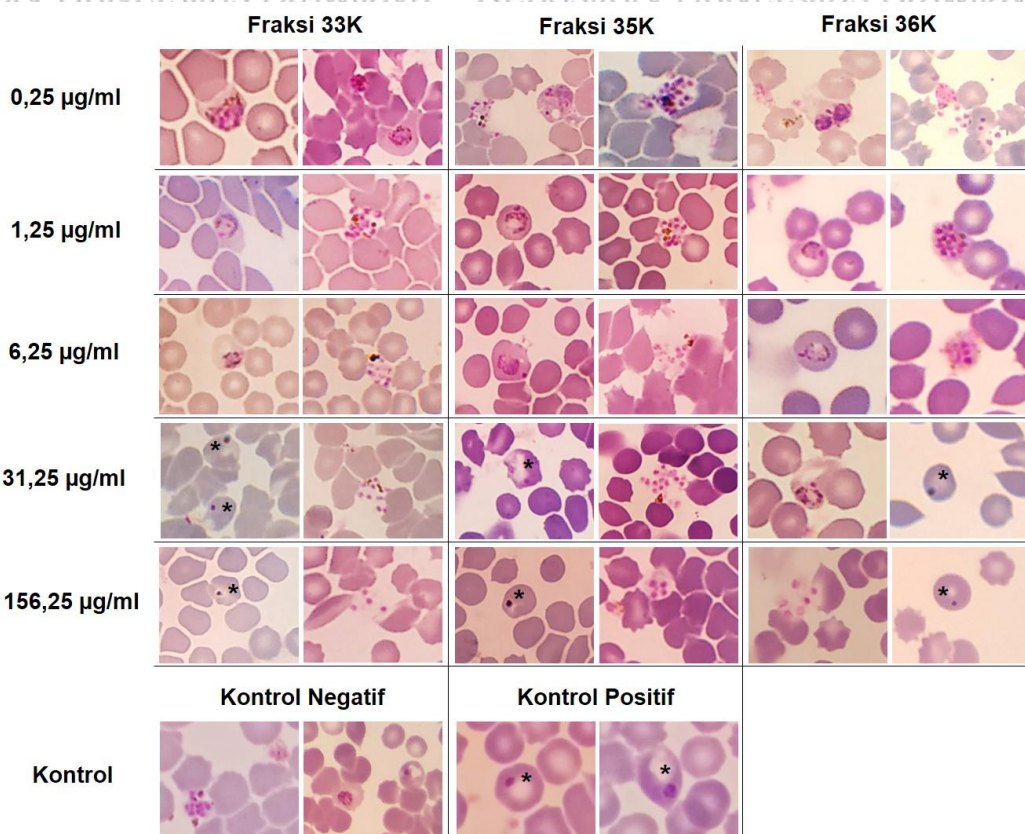
Gambar 4. 3 Bagan Alur Penelitian. Fraksi 33K, 35K dan 36K memiliki dua pengujian yaitu uji efektivitas dengan mengukur presentase penghambatan densitas parasit dan melihat perubahan morfologinya serta uji toksisitas untuk mengukur presentase jumlah sel yang mati untuk mengetahui sifat toksisitas terhadap sel manusia. Apabila presentase penghambatan mencapai 50% maka ditentukan nilai IC_{50} dan apabila presentase toksisitas mencapai 50% maka akan ditentukan nilai LC_{50} .



BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1 Morfologi *Plasmodium berghei*

Evaluasi efek ekstrak fraksi 33K, 35K dan 36K pada morfologi *P. berghei* stadium intraeritrosit dilakukan menggunakan apusan darah dengan pewarnaan giemsa dan visualisasi menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x. Morfologi parasit diamati setelah 48 jam inkubasi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.1. Identifikasi morfologi *Plasmodium berghei* terdiri dari pengenalan dua ciri khas yaitu inti/kromatin dengan warna merah dan bentuk bulat, serta sitoplasma yang umumnya berwarna biru-abu dan memiliki bentuk seperti cincin hingga bentuk tidak beraturan disekitar inti.



Gambar 5.1 Morfologi *Plasmodium berghei* yang menginfeksi eritrosit. Morfologi parasit diamati pada perbesaran 100x dengan pewarnaan giemsa. Tanda bintang * menunjukkan *crisis form*.



Pada konsentrasi 0,25 µg/ml, fraksi 33K menunjukkan skizon imatur, skizon matur dan trophozoit sebagai stadium dominan parasit. Pada stadium skizon ada beberapa fase berawal dari parasit yang memiliki dua inti hingga parasit yang memiliki inti dengan sitoplasma pada masing-masing inti parasit. Sedangkan fraksi 35K menunjukkan skizon imatur dan trophozoit sebagai stadium yang dominan.

Fraksi 36K menunjukkan skizon imatur dengan pigmen dan skizon ruptur dengan banyak merozoit. Selain itu banyak ditemukan eritrosit yang terinfeksi parasit pada hampir semua lapang pandang.

Pada konsentrasi 1,25 µg/ml, fraksi 33K menunjukkan bentuk ameboid tidak beraturan dan skizon ruptur dengan warna inti yang lebih pucat. Fraksi 35K menunjukkan ring-form trophozoit dan skizon ruptur dengan ireguler sitoplasma.

Fraksi 36K menunjukkan ring-form trophozoit dengan sitoplasma rusak dan vakuola besar, selain itu ada skizon matur yang dominan dengan sitoplasma tebal dan banyak merozoit di dalamnya.

Pada konsentrasi 6,25 µg/ml, fraksi 33K menunjukkan banyak eritrosit yang terinfeksi merozoit dan trophozoit dengan sitoplasma yang besar. Ditemukan juga skizon ruptur dengan sitoplasma yang iregular dan berwarna pucat. Fraksi 35K menunjukkan morfologi trophozoit dengan sitoplasma yang besar dengan warna inti pucat dan skizon ruptur dengan jumlah inti yang kehilangan pigmen dan sitoplasma pucat. Sedangkan fraksi 36K menunjukkan banyak bentuk trophozoit yang tidak beraturan dan ditemukan juga bentuk skizon matur dengan sitoplasma yang mengecil.

Pada konsentrasi 31,25 µg/ml, fraksi 33K menunjukkan inti sel dengan sitoplasma yang tidak beraturan dan rusak serta trophozoit dalam *crisis form*, selain itu juga tampak skizon ruptur dengan inti merozoit yang semakin pucat. *Crisis form* ditandai dengan semakin hilangnya sitoplasma, inti nukleus yang tertarik ke tepi sitoplasma parasit, dan kromatin yang tampak tebal, padat, serta gelap. Pada



fraksi 35K juga ditemukan *crisis form* dengan vakuola besar, nukleus ditarik ke tepi sitoplasma parasit, dan mulai rusak. Pada fraksi ini juga tampak skizon ruptur dengan inti lebih pucat dan sitoplasma yang semakin menghilang. Sedangkan fraksi 36K menunjukkan skizon muda yang gagal tumbuh dengan ukuran eritrosit yang membesar, adanya vakuola, dan kerusakan sitoplasma, selain itu juga tampak trofozoit *crisis form* dengan inti gelap di tepi sitoplasma.

Pada konsentrasi 156,25 µg/ml fraksi 33K menunjukkan *crisis form* yang dominan, merozoit pada skizon matur ditemukan lebih sedikit daripada konsentrasi lainnya. Pada fraksi 35K tampak *crisis form* yang dominan dan skizon matur dengan sitoplasma yang rusak. Fraksi 36K menunjukkan banyak eritrosit bebas parasit, merozoit pada skizon matur memiliki inti merozoit sedikit dan sitoplasma yang rusak, dan dominan ditemukan *crisis form*.

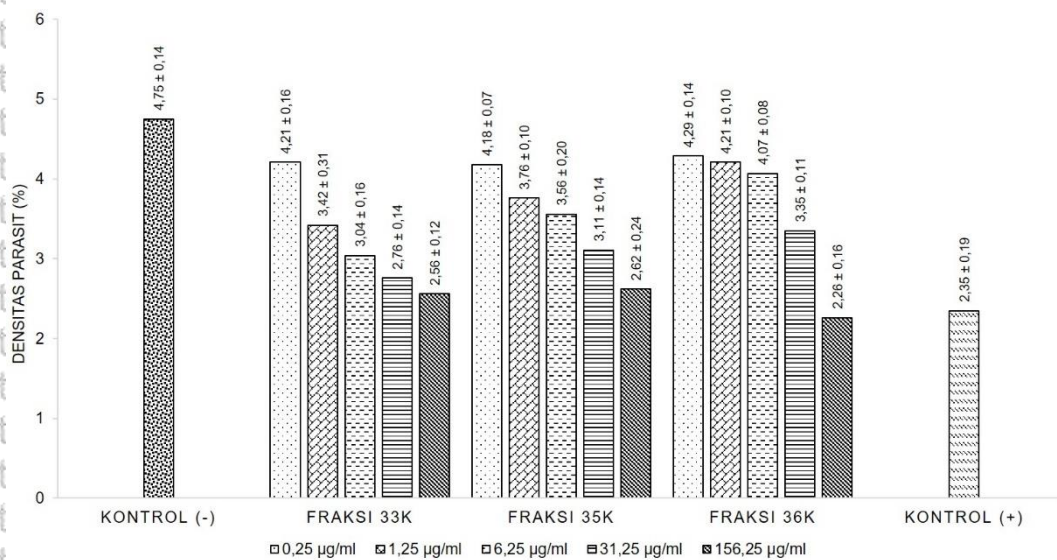
Kontrol negatif menunjukkan fase skizon ruptur dan trofozoit dengan inti yang berwarna merah dan berbentuk bulat, serta sitoplasma yang berbentuk bulat seperti cincin hingga sitoplasma dengan bentuk tidak beraturan disekitar inti yang umumnya berwarna biru-abu yang merupakan bentuk morfologi *P. berghei* sehat. Selain itu tampak banyak merozoit yang belum matang diamati di luar eritrosit.

Kontrol positif menunjukkan banyak eritrosit yang terinfeksi parasit berbentuk tidak beraturan dengan sitoplasma yang besar dan rusak akibat edema sel, skizon jarang ditemukan, dan sebagian besar stadium parasit gagal tumbuh dengan ciri *crisis form*.

5.2 Efektivitas Fraksi 33K, 35K dan 36K dalam Penghambatan Densitas *Plasmodium berghei*

Efek penghambatan densitas parasit dari intervensi yang diberikan diukur menggunakan rumus densitas parasit dan rumus persentase penghambatan eritrosit yang terinfeksi parasit setelah dilakukan pengamatan dengan mikroskop

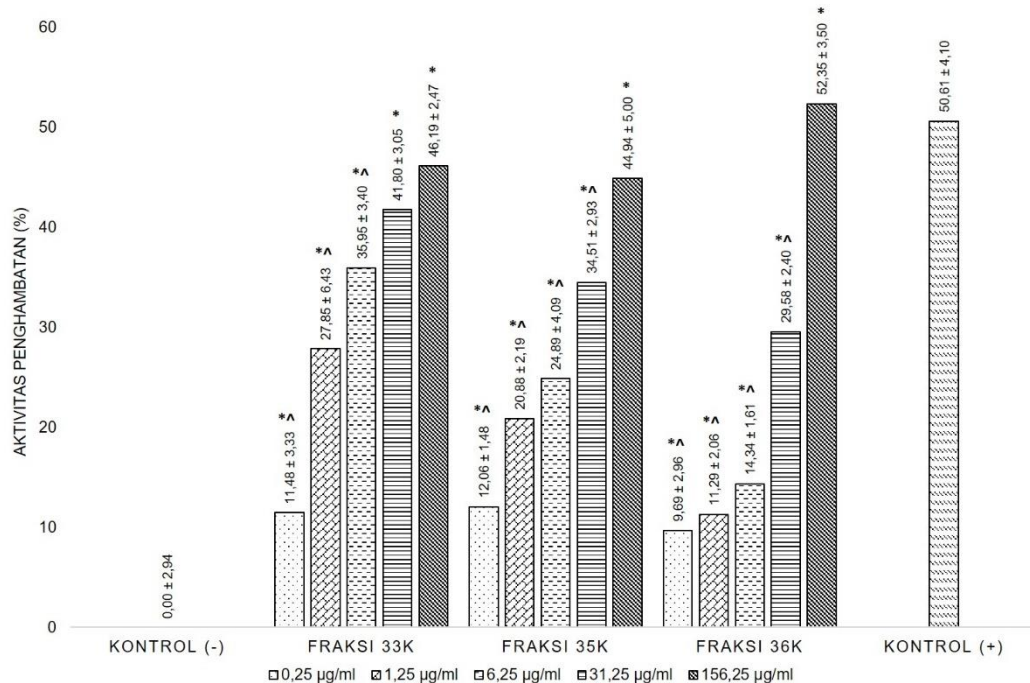
cahaya. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 1000x dan preparat dengan pewarnaan giemsa. Gambar 5.2 menampilkan densitas parasit dan Gambar 5.3 menampilkan persentase aktivitas penghambatan fraksi 33K, 35K dan 36K ekstrak metabolit sekunder *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus*. Pada uji efektivitas ini menggunakan beberapa konsentrasi yaitu 0.25 µg/ml, 1.25 µg/ml, 6.25 µg/ml, 31.25 µg/ml, dan 156.25 µg/ml. Dalam penelitian ini kontrol negatif tidak mendapat intervensi apapun, memiliki nilai persentase densitas parasit $4,75 \pm 0,14$ dan memiliki inhibisi parasit nol persen. Kontrol positif menggunakan Artemisinin 0,01 mM dengan nilai persentase densitas parasit $2,35 \pm 0,19$ dan nilai persentase penghambatan densitas parasit $50,61 \pm 4,10$.



Gambar 5. 2 Persentase Densitas Parasit Fraksi 33K, 35K dan 36K. Persentase densitas parasit memiliki trend grafik batang yang menurun seiring dengan bertambahnya konsentrasi.

Fraksi 33K, 35K, dan 36K mampu menghambat densitas parasit secara signifikan ($p < 0,05$) ditandai dengan penurunan dalam persentase sel eritrosit yang terinfeksi apabila dibandingkan dengan kontrol negatif. Persentase densitas parasit memiliki nilai paling tinggi pada konsentrasi 0.25 µg/ml dan semakin menurun persentasenya hingga konsentrasi tertinggi 156.25 µg/ml. Fraksi 36K

memiliki nilai persentase densitas parasit paling rendah pada konsentrasi 156,25 µg/ml dibandingkan fraksi 33K, 35K dan kontrol negatif yang tidak diberikan perlakuan. Akan tetapi, apabila dibandingkan dengan kontrol positif, nilai persentase densitas parasit fraksi 36K tidak berbeda secara signifikan.



Gambar 5. 3 Persentase Aktivitas Penghambatan Densitas Parasit Fraksi 33K, 35K dan 36K. Persentase aktivitas penghambatan memiliki trend grafik batang yang meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi. Fraksi 36K memiliki nilai persentase aktivitas penghambatan paling tinggi pada konsentrasi 156,25 µg/ml dan apabila dibandingkan dengan kontrol positif tidak berbeda signifikan. Tanda (*) menunjukkan nilai signifikan terhadap konsentrasi negatif. Tanda (^) menunjukkan nilai signifikan terhadap konsentrasi positif.

Fraksi 33K menunjukkan persentase inhibisi terbesar pada konsentrasi 156,25 µg/ml, namun masih lebih rendah dibandingkan dengan persentase inhibisi kontrol positif. Pada uji ANOVA memperlihatkan perbedaan bermakna pada persentase penghambatan antara kelompok intervensi dengan nilai $p = 0,000$.

Nilai $r = 0,931$ dan $P\text{-value} = 0,000$ pada uji korelasi *Pearson* memperlihatkan signifikansi hubungan dengan korelasi yang positif, yaitu semakin tinggi nilai konsentrasi fraksi, semakin tinggi persentase penghambatan parasit. $R^2 = 0,866$



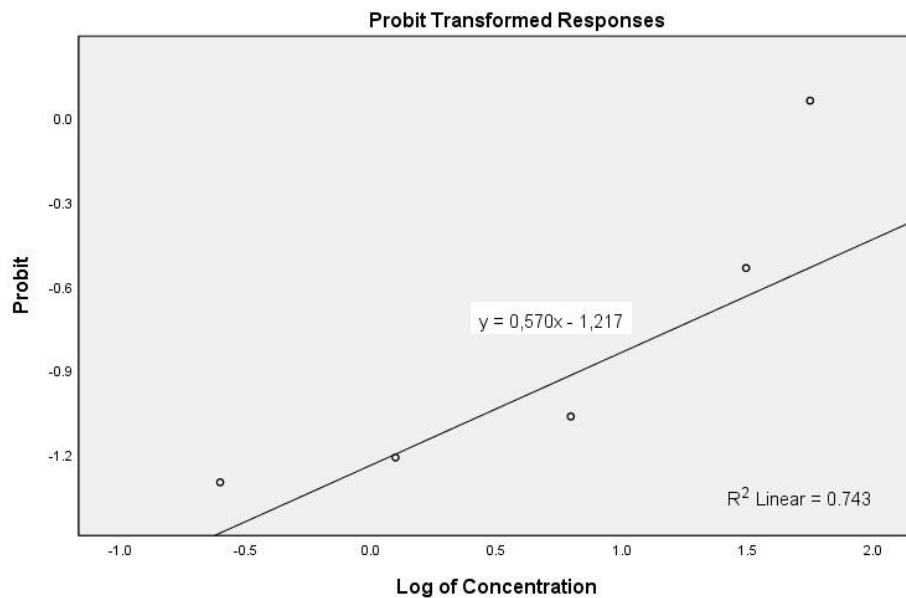
dari analisis regresi linier menunjukkan bahwa pemberian fraksi 33K bertanggung jawab atas 86,6% pada persentase aktivitas penghambatan densitas parasit.

Fraksi 35K juga menunjukkan persentase inhibisi terbesar pada konsentrasi 156,25 $\mu\text{g/ml}$, namun masih lebih rendah dibandingkan dengan persentase inhibisi kontrol positif. Pada uji ANOVA memperlihatkan perbedaan bermakna pada persentase penghambatan antara kelompok intervensi dengan nilai $p = 0,000$. Selanjutnya pada uji korelasi *Pearson* ditemukan nilai $r = 0,962$ dan $P\text{-value} = 0,000$. Hal ini memperlihatkan signifikansi hubungan dengan korelasi positif yaitu semakin tinggi nilai konsentrasi fraksi, semakin tinggi persentase penghambatan parasit. Pada analisis regresi linier ditemukan nilai $R^2 = 0,926$ yang menunjukkan bahwa pemberian fraksi 35K bertanggung jawab atas 92,6% penghambatan densitas parasit.

Fraksi 36K juga menunjukkan persentase inhibisi terbesar pada konsentrasi 156,25 $\mu\text{g/ml}$, dan sedikit lebih tinggi dibandingkan persentase inhibisi kontrol positif. Pada uji ANOVA memperlihatkan perbedaan bermakna pada persentase penghambatan antara kelompok intervensi dengan nilai $p = 0,000$. Nilai $r = 0,903$ dan $P\text{-value} = 0,000$ ditemukan menggunakan uji korelasi *Pearson*, memperlihatkan signifikansi hubungan dengan korelasi positif yaitu semakin tinggi nilai konsentrasi fraksi, semakin tinggi persentase penghambatan parasit. $R^2 = 0,816$ dari analisis regresi linier menunjukkan pemberian fraksi 36K bertanggung jawab atas 81,6% penghambatan densitas parasit.

Dibandingkan fraksi 33K dan 35K, fraksi 36K memiliki nilai persentase inhibisi tertinggi di konsentrasi tersebut dengan nilai persentase inhibisi $52,35 \pm 3,50$, hal ini menunjukkan nilai fraksi 36K sedikit lebih tinggi bila dilakukan perbandingan dengan kontrol positif yaitu $50,61 \pm 4,10$. Oleh karena itu dapat ditentukan nilai IC_{50} fraksi 36K. *Inhibitory Concentration 50* (IC_{50}) merupakan konsentrasi dari *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* yang mampu

menyebabkan 50% penghambatan densitas parasit. Pada penelitian ini digunakan analisis probit inhibisi parasit untuk menghitung IC_{50} , dilanjutkan dengan analisis regresi linier menggunakan SPSS. Analisis probit dari fraksi 36K dengan persamaan $y = 0,570x - 1,217$ dengan $R^2 = 0,743$. Berdasarkan persamaan tersebut dapat diketahui nilai IC_{50} untuk fraksi 36K yaitu pada konsentrasi 135.913 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar 5. 4 Analisis Probit Nilai IC_{50} fraksi 36K. Analisis probit dari fraksi 36K memiliki persamaan $y = 0,570x - 1,217$ dengan $R^2 = 0,743$.

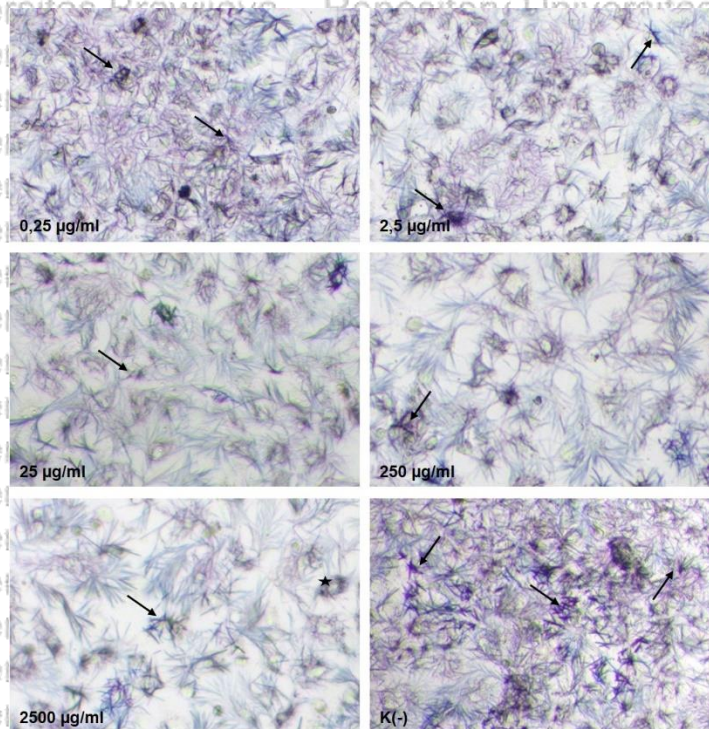
5.3 Uji Toksisitas Fraksi 33K, 35K dan 36K

Uji toksisitas dilakukan pada MCF-7 *cell line* menggunakan MTT assay dan dibaca menggunakan *microplate reader* dengan hasil nilai berupa *optical density*.

Uji toksisitas menggunakan konsentrasi uji 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ dan 2500 $\mu\text{g/ml}$. Uji toksisitas dilakukan pada fraksi 36K saja karena memiliki nilai aktivitas antimalaria paling baik dibandingkan fraksi 33K dan 35K. Pada uji toksisitas dapat diamati adanya kristal violet-biru (formazan) pada setiap well. Sel yang memiliki reaksi terhadap reagen MTT adalah sel yang hidup ditandai dengan



pembentukan formazan. Gambar 5.4 menunjukkan formazan yang terbentuk pada tiap konsentrasi fraksi 36K. Pada semua konsentrasi uji tampak banyak formazan terbentuk pada masing-masing well yang diamati menggunakan mikroskop inverted. Semakin tinggi konsentrasi fraksi, formazan yang terbentuk semakin sedikit dan warna biru keunguan semakin memudar pada fraksi 36K dibandingkan dengan kontrol negatif.



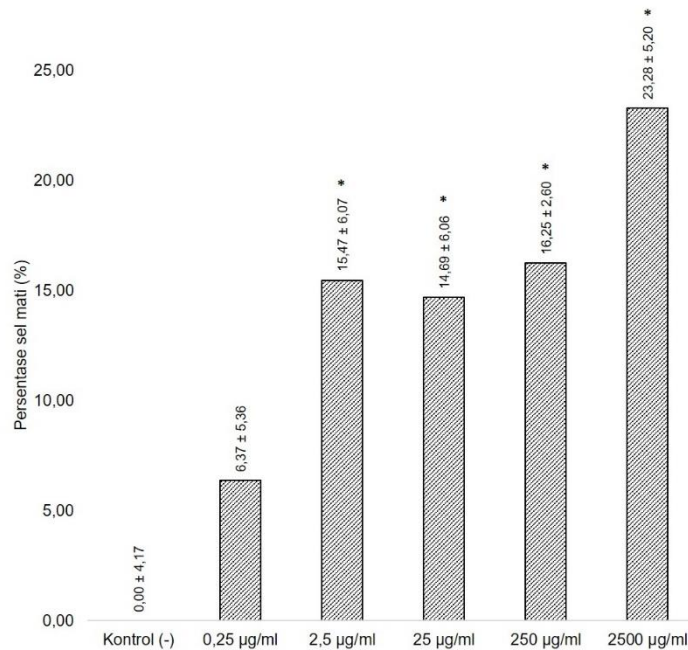
Gambar 5. 5 Formazan yang terbentuk pada Fraksi 36K.

Keterangan: 0,25 µg/ml (A); 2,5 µg/ml (B); 25 µg/ml (C); 250 µg/ml (D); 2500 µg/ml (E); Kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak fraksi 36K (F). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 100x. Formazan tampak berwarna violet-biru ditunjukkan dengan tanda panah.

Pada uji toksisitas fraksi 36K, semua konsentrasi memiliki nilai toksisitas kurang dari 50%. Fraksi 36K ekstrak metabolit sekunder *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* dengan konsentrasi tertinggi 2500 µg/ml memiliki nilai persentase kematian sel sebesar 23,28% yang mana tidak mencapai nilai 50% dari kematian sel. Oleh karena itu, nilai LC_{50} belum dapat ditentukan dalam penelitian ini. Uji sitotoksitas fraksi 36K pada analisis ANOVA memperlihatkan perbedaan



bermakna antara kelompok intervensi dengan nilai $p=0,000$. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi 36K metabolit sekunder *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* bersifat tidak toksik terhadap sel manusia.



Gambar 5. 6 Grafik Nilai Uji Toksisitas Fraksi 36K. Analisis diagram tingkat sitotoksitas fraksi 36K ekstrak metabolit *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* menunjukkan bahwa semua persentase konsentrasi kematian sel lebih rendah dari 50%. Analisis tersebut dibandingkan dengan kontrol negatif yang dianggap memiliki nilai persentase kematian sel nol. Tanda (*) menunjukkan nilai signifikan terhadap konsentrasi negatif.



BAB VI PEMBAHASAN

Banyaknya kasus resistensi terhadap obat antimalaria telah menjadi kebutuhan mendesak untuk mengembangkan senyawa antimalaria baru.

Streptomyces sp. adalah bakteri gram positif yang telah dikenal luas aktivitasnya sebagai antimikroba, antijamur, antikanker, dan antiparasit salah satunya malaria (Lima *et al.*, 2016). Penelitian ini akan menganalisis efektivitas fraksi 33K, 35K dan 36K ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* sebagai antimalaria dan mengetahui sifat sitotoksitasnya terhadap sel manusia.

Berdasarkan fraksinasi yang dilakukan pada penelitian Ariel *et al.* (2021), terdapat total 47 fraksi dari fraksinasi pertama (Sepacore® Flash Chromatography) dan 60 fraksi dari fraksinasi kedua (Reveleris® PREP Purification System Chromatography), dengan bobot fraksi yang berbeda dari hasil fraksinasi setiap tabung. Fraksinasi dilakukan menggunakan *thin-layer chromatography* (TLC) dengan kombinasi pelarut etil asetat dan heksana yang dilakukan untuk menyederhanakan berbagai komponen kandungan dari sampel ekstrak *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* (Ariel *et al.*, 2021).

Hasil pengamatan fraksinasi kemudian dilakukan pengamatan pada beberapa gelombang sinar UV. Fraksinasi pertama pada panjang gelombang 254 nm ditemukan plot abu-abu tua pada fraksi 33K, 35K, dan 36K. Namun pada panjang gelombang 366 nm, pada fraksi 33K ditemukan plot biru terang dengan nilai *retardation factor* (Rf) 0,7 dan 0,28. Kemudian dilakukan perbandingan hasil dengan literatur dan dapat disimpulkan bahwa fraksi 33K, 35K, dan 36K mengandung monoterpen, triterpen, atau steroid karena karakteristik plot yang mirip dengan literatur (Kagan & Flythe, 2014). Hasil pengamatan pada fraksinasi kedua dengan nilai Rf 0,24 pada panjang gelombang 366 nm dan 254 nm sinar



UV ditemukan plot hitam dan plot biru secara berurutan menunjukkan fraksi 36K memiliki golongan senyawa turunan kumarin, skopoletin, atau alkaloid (Ariel et al., 2021).

6.1 Uji Efektivitas *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*

Berdasarkan hasil penelitian ini, fraksi 33K, 35K dan 36K ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* memiliki efektivitas sebagai antimalaria secara *in vitro*. Ketiga fraksi ini mampu menghambat dan merusak morfologi tahap perkembangan parasite *P. berghei* yang dominan terlihat pada fase trofozoit dan skizon. Apabila dibandingkan dengan kontrol negatif yang tidak diberikan perlakuan, dapat diketahui apabila pada konsentrasi 0,25 µg/ml, fraksi ekstrak 33K, 35K dan 36K tidak memiliki aktivitas penghambatan yang signifikan terhadap perubahan. Akan tetapi seiring bertambahnya konsentrasi dijumpai banyak kelainan morfologi dan ditemukan adanya *crisis form* sebagai bentuk eritrosit terinfeksi yang memiliki viabilitas rendah (Nugraha et al., 2013). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antimalaria fraksi 33K, 35K dan 36K merupakan hasil interaksi aditif atau sinergis dari berbagai komponen senyawa metabolit sekunder dalam fraksi tersebut. Hasil pada penelitian ini tidak memiliki perbedaan dengan penelitian sebelumnya yang telah membuktikan bahwa ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* dapat merusak morfologi parasit. Skizon dan trofozoit gagal berkembang dan tampak rusak secara morfologis dengan hilangnya kandungan sitoplasma dan inti pycnotic (Fitri et al., 2019; Nugraha et al., 2013).

Pada penelitian ini menggunakan *Plasmodium berghei* sebagai model parasit untuk menggambarkan penyakit malaria karena *P. berghei* adalah parasit yang paling umum digunakan dalam uji *in vitro* dan memiliki aksesibilitas yang lebih tinggi (Kifle et al., 2020). *Plasmodium berghei* umumnya digunakan dalam menilai aktivitas antiplasmodial agen baru karena semua tahap siklus hidup parasit terlihat pada apusan darah dan memiliki sifatnya yang *nonadherence* terhadap sel endotel



(Nureye *et al.*, 2021). Selain itu pada penelitian ini peneliti fokus pada uji secara *in vitro* karena lebih cepat dan akurat untuk mengamati kerapuhan parasit akibat agen antimalaria, tanpa ada gangguan dari faktor inang (Maji, 2018).

Berdasarkan hasil penelitian ini, fraksi 33K, 35K dan 36K ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* dapat menghambat densitas *P. berghei* secara *in vitro*. Hasil ini menggambarkan bahwa semakin tinggi konsentrasi fraksi maka semakin tinggi persentase penghambatan densitas parasitnya. Fraksi 36K menunjukkan potensi yang lebih besar dalam menghambat densitas parasit dibandingkan fraksi 33K dan 35K, dengan daya hambat terbesar hingga 52,35% pada konsentrasi 156,25 µg/ml. Penelitian ini menunjukkan apabila *S. hygroscopicus* memiliki sifat antimalaria terhadap *Plasmodium sp.*, sama seperti penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak metanol metabolit sekunder *Streptomyces sp.* terhadap *P. falciparum* dengan konsentrasi 100 µg/ml mampu menekan rata-rata densitas pertumbuhan *P. falciparum* sebesar 0,66 % dengan nilai penghambatan rata-rata 95,20% (Sandy *et al.*, 2020). Studi lain menunjukkan bahwa persentase efek penghambatan ekstrak metabolit sekunder *S. hygroscopicus* tertinggi terhadap eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* adalah 2,6 mg/ml dengan persentase penghambatan 69,8% dan 13 mg/ml dengan persentase penghambatan 67,3% (Fitri *et al.*, 2019). Penelitian dengan topik yang sama sebelumnya menyatakan bahwa fraksi lain ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* yaitu fraksi 15 dan 16 menunjukkan penghambatan densitas pertumbuhan parasit lebih dari 50% dengan uji enzim laktat dehidrogenase (PFLDH) yang memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kultur *P. falciparum* (Cahyono *et al.*, 2020).

Pada penelitian ini, nilai IC_{50} diperoleh menggunakan analisis probit dengan konsentrasi log yang dikonversi dari persentase penghambatan pada SPSS. Nilai IC_{50} menunjukkan kemampuan fraksi 36K ekstrak metabolit *S.*



hygroscopicus subsp. *Hygroscopicus* dalam menghambat densitas pertumbuhan *P. berghei* pada eritrosit secara *in vitro* sebesar 50%. Apabila efektivitas penghambatan densitas pertumbuhan *P. berghei* semakin tinggi maka nilai IC₅₀ akan semakin rendah. Data sebelumnya mengklasifikasikan aktivitas antiplasmodial menjadi 4 yaitu *inactive* (IC₅₀ > 50 µg/ml), *moderate* (15 < IC₅₀ < 50 µg/ml), *promising* (5 < IC₅₀ < 15 µg/ml) dan *high* (IC₅₀ < 5 µg/ml) (Lekana-Douki *et al.*, 2011; Ogbeide *et al.*, 2018). Hasil analisis IC₅₀ fraksi 36K terhadap *P. berghei* adalah 135,91 µg/ml yang termasuk pada klasifikasi *inactive*. Akan tetapi, fraksi 36K pada penelitian ini menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih menjanjikan dibandingkan fraksi 33K dan 35K. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan nilai IC₅₀ ekstrak *Streptomyces* sp. AB8 terhadap *P. falciparum* 3D7 *in vitro* adalah 17,56 µg/ml (Arifiyanto *et al.*, 2021). Studi lain menyatakan bahwa penghambatan parasit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* strain i18 terhadap *P. falciparum* *in vitro* yang diukur dengan analisis probit adalah 11,07 µg/ml (Setyaningrum *et al.*, 2021).

6.2 Uji Toksisitas *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*

Dalam pengembangan obat baru, penting untuk menguji toksisitas dari senyawa tersebut. Penelitian toksisitas pra klinis pada banyak sistem biologis menunjukkan efek yang berbahaya dari senyawa yang diteliti pada tingkat spesifik seperti spesies, organ, maupun sel (Arifiyanto *et al.*, 2021). Pada penelitian ini, menggunakan *cell line* MCF-7 karena sel ini termasuk sel kanker payudara yang kerap dipakai dalam uji toksisitas. Penggunaan sel MCF-7 pada uji toksisitas juga telah dilakukan pada penelitian sebelumnya yang juga meneliti efek obat antimalaria dalam kombinasi dengan obat kanker ataupun dalam monoterapi (Duarte & Vale, 2020; Parasuraman, 2011; Suberu *et al.*, 2014). Selain itu, terdapat penelitian lain yang membuktikan bahwa obat antimalaria memiliki efek sinergis dengan obat antikanker (Suberu *et al.*, 2014). Sel-sel kanker memiliki sifat



yang lebih rentan terhadap obat-obatan toksik daripada kebanyakan sel normal karena mereka secara aktif membelah dengan kecepatan yang jauh lebih besar, dan ini terkait dengan proses mitosis serta replikasi DNA dalam sel kanker (Lange *et al.*, 2011; Mabeta *et al.*, 2018). Sehingga pada penelitian ini mencoba melakukan eksperimen sitotoksitas pada sel MCF-7 dengan karakteristik kualitas sel yang sangat baik dan tipe sel yang melekat dengan metode kultur monolayer, sehingga lebih mudah diditeliti dibandingkan sel normal (Silano *et al.*, 2005).

Sitotoksitas fraksi 36K diuji menggunakan MTT assay pada lima konsentrasi berbeda dengan peningkatan eksponensial (0,25; 2,5; 25; 250; dan 2500 µg/ml). MTT assay merupakan suatu sistem pengujian berbasis kolorimetri dengan melihat pembentukan formazan violet-biru oleh reduktase tetrazolium suksinat dengan pengukuran reduksi garam MTT kuning, proses ini terjadi pada mitokondria sel hidup dalam rantai respirasinya. Reagen MTT dapat melewati membran sel serta membran dalam mitokondria dari sel karena muatan positifnya serta struktur lipofiliknya kemudian direduksi menjadi formazan oleh sel secara metabolik (Berridge *et al.*, 2005; Stockert *et al.*, 2018). Hasilnya akan dibaca menggunakan *microplate reader* dalam bentuk unit *optical density*. Menurut Clarkson's *toxicity index*, $LC_{50} < 1000$ µg/ml menunjukkan toksik, sedangkan $LC_{50} > 1000$ µg/ml menunjukkan tidak toksik (Clarkson *et al.*, 2004). Fraksi 36K menunjukkan nilai $LC_{50} < 1000$ µg/ml, sehingga dapat diketahui apabila fraksi ini memiliki rentang dosis atau konsentrasi yang aman dan bersifat tidak toksik terhadap sel MCF-7, yang mana sel kanker bersifat lebih sensitif terhadap toksikologi obat dibandingkan sel normal (Lange *et al.*, 2011; Mabeta *et al.*, 2018).

Penelitian sebelumnya telah meninjau banyak senyawa metabolit sekunder fraksi 33K, 35K dan 36K yang memiliki aktivitas antimalaria. Golongan senyawa yang ada pada fraksi 33K, 35K dan 36K antara lain yaitu monoterpen, triterpen, steroid, serta kumarin, skopoletin, dan alkaloid (Ariel *et al.*, 2021). Bahan



kimia terpenoid dan turunannya memiliki struktur yang dapat melewati lipid bilayer membran eritrosit dan menghambat sintesis protein pada sel parasit (Clarkson *et al.*, 2004). Bentuk membran eritrosit berubah menjadi stomatosit atau ekinosit tergantung pada kemampuan ikatan hidrogennya; kedua jenis perubahan eritrosit tersebut dapat menginvasi dan menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* (Clarkson *et al.*, 2004). Terpene dapat mencegah sintase isoprenil difosfat dari kondensasi molekul IPP dan substrat isoprenik lainnya menjadi rantai isoprena, mencegah parasit menghasilkan biomolekul poliisoprenoid (Ziegler *et al.*, 2004). Terpene juga dapat bersaing dengan sejumlah enzim yang memanfaatkan senyawa isoprenik sebagai substrat, mencegah produksi senyawa isoprenoid, seperti rantai isoprenik dari cincin benzokuinon ubikuinon pada tahap skizon (Gabriel *et al.*, 2018; Ziegler *et al.*, 2004).

Substansi lain juga ditemukan pada ekstrak metabolit *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* fraksi 36K adalah coumarin yang dikenal luas karena efek antiplasmodialnya (Alberts *et al.*, 2002; Goulart *et al.*, 2004; Kaushik & Chahal, 2021; Tanjung *et al.*, 2016). Daphetin atau 7,8-dihidroksikoumarin sebagai salah satu senyawa coumarin dapat menghambat aktivitas *P. falciparum* secara *in vitro* dengan mencegah sintesis DNA (Moon *et al.*, 2011). Penghambatan dalam proses sintesis DNA dapat menghambat replikasi parasit, yang menyebabkan parasit mati karena kekurangan protein penting untuk fungsi metabolisme parasit (Goulart *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2011). Daphnetin dapat mensupresi sintesis DNA pada tahap trophozoit selama fase perkembangan *P. falciparum* (Moon *et al.*, 2011). Salah satu turunan coumarin yaitu scopoletin (Susidarti, 2014), adalah salah satu kandungan senyawa fraksi 36K. Namun, scopoletin (7-hidroksi,6-metoksikoumarin) tampaknya tidak memiliki aktivitas antiplasmodial *in vitro* karena tidak adanya gugus hidroksil pada posisi C-8 (Yang *et al.*, 1992).



Golongan senyawa lain dalam ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* adalah alkaloid. Pada penelitian sebelumnya, alkaloid lemah yaitu triptanthrin memiliki afinitas yang kuat terhadap protein target *Plasmodium falciparum* Aminopeptidase M1 (PfA-M1), Falcipain 2 Protease, dan *P. falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT), yang telah dibuktikan terdapat dalam fraksi 41 dan 44 dalam studi *in vivo* dan *in silico* (Fitri *et al.*, 2021). Aktivitas antimalaria tryptanthrin melibatkan pemblokiran jalur enzim glikolisis *Plasmodium*, mencegah detoksifikasi heme, dan menyebabkan hematin mengkristal melalui interaksi dengan heme dan hematin (Onambele *et al.*, 2015). Tryptanthrin juga menghambat aktivitas gametosit stadium dewasa yang sangat penting untuk transfer eksflagelasi dari manusia ke nyamuk (Delves *et al.*, 2013).

Dalam penelitian ini terdapat beberapa keterbatasan dalam uji toksisitas, yaitu hanya menggunakan sel kanker yang tersedia di laboratorium sebagai model uji toksisitas. Sehingga pada penelitian ini hanya dapat menunjang hasil bahwa ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* tidak toksik terhadap sel kanker khususnya sel MCF-7, akan tetapi pada sel normal masih belum dapat diketahui nilai toksisitasnya. Kemudian, penelitian ini belum dapat menentukan nilai *selectivity index* (SI) karena dalam perhitungannya perlu dilakukan pada sel normal. Indeks selektivitas sering dilaporkan dalam literatur sebagai rasio sederhana IC_{50} yang dihitung pada sel sehat dan sel kanker. Indeks selektivitas ini dapat mengukur batas antara sitotoksitas dan aktivitas suatu zat dan dihitung sebagai ukuran yang tepat untuk menunjukkan variabilitas yang signifikan dari suatu ekstrak. Obat yang ideal harus memiliki konsentrasi toksik yang relatif tinggi tetapi dengan konsentrasi aktif yang sangat rendah. Evaluasi nilai SI untuk setiap penelitian tentang obat herbal dan/atau senyawa terisolasi sangat penting untuk menentukan apakah penelitian selanjutnya dapat dilakukan.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa fraksi 33K, 35K dan 36K ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus* memiliki efek antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* dan bersifat tidak toksik sebagai kandidat obat antimalaria potensial baru dalam uji *in vitro*.

1. Nilai IC_{50} pada fraksi nomor 33K dan 35K belum dapat ditentukan pada penelitian ini, karena dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 156,25 $\mu\text{g/ml}$ fraksi 33K dan 35K memiliki nilai presentase kematian sel sebesar 46,19% dan 44,94% yang mana tidak mencapai 50% (IC_{50}). Sedangkan, fraksi 36K memiliki nilai presentase penghambatan sebesar 52,36% dengan konsentrasi 156,25 $\mu\text{g/ml}$, sehingga diketahui nilai IC_{50} fraksi 36K dengan analisis probit yaitu pada konsentrasi 135.913 $\mu\text{g/ml}$.
2. Fraksi nomor 33K, 35K, dan 36K ekstrak metabolit sekunder *Streptomyces hygroscopicus* subs. *hygroscopus* mampu merusak morfologi *Plasmodium berghei* ditandai dengan penemuan *crisis form*.
3. Fraksi nomor 36K merupakan fraksi dengan penghambatan densitas parasit terbaik daripada fraksi 33K dan 35K. Fraksi 36K terbukti memiliki efek non toksik terhadap MCF7 *Breast Cancer Cell Line* secara *in vitro*. Akan tetapi, nilai LC_{50} fraksi 36K pada penelitian ini belum dapat ditentukan karena dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 2500 $\mu\text{g/ml}$, fraksi 36K memiliki nilai presentase kematian sel sebesar 23,28% yang mana tidak mencapai 50% (LC_{50}).



7.2 Saran

1. Penting untuk dilakukan eksperimen lanjutan seperti HPLC, Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LCMS/MS) dan Nuclear Magnetic Resonance (NMR) untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif kandungan fraksi 33K, 35K dan 36K metabolit ekstrak *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus*.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengetahui khasiat senyawa bioaktif dari fraksi 33K, 35K dan 36K metabolit ekstrak *S. hygrosopicus* subsp. *Hygrosopicus* sebagai obat antimalaria yang potensial pada uji *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, S. J., Abdul Rahim, M. B. H., Baharum, S. N., Baba, M. S., & Zin, N. M. (2017). Discovery of Antimalarial Drugs from Streptomyces Metabolites Using a Metabolomic Approach. *Journal of Tropical Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2189814>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *From DNA to RNA*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>
- Ariel, D. G., Winarsih, S., Putri, F. F., Erwan, N. E., Putri, A. M., Cahyono, A. W., Mardhiyyah, K., Fitri, L. E., & Nugraha, R. Y. B. (2021). Optimization of Combination of N-Hexane Solution and Ethyle Acetate on Secondary Metabolite Compounds Profile of Streptomyces hygrosopicus. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 31(3), 186–192. <https://doi.org/10.21776/UB.JKB.2021.031.03.11>
- Arifiyanto, A., Setyaningrum, E., Nukmal, N., & Aeny, T. N. (2021). Short Communication: In vitro antimicrobial and antimalarial screening of a crude extract of Streptomyces sp. AB8 isolated from Lapindo Mud Volcano Area, Sidoarjo, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(7), 2817–2823. <https://doi.org/10.13057/BIODIV/D220731>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Cahyono, A. W., Fitri, L. E., Nafisatuzzamrudah, Nugraha, R. Y. B., Aulia, R., Febriliani, F., Giovanni Ariel, D., Mardhiyyah, K., Winarsih, S., Suciati, Japany, D., Endang, E., & Waluyo, D. (2020). Non-Toxic Fractions of Streptomyces hygrosopicus Subsp. Hygrosopicus Metabolite Suppressed the Growth of Plasmodium Falciparum in Vitro Possibly through L-malate: Quinone Oxidoreductase (PfMQO) Mitochondrial Enzyme Inhibition. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(10), 524–531. <https://doi.org/10.31838/SRP.2020.10.79>
- Cahyono, A. W., Fitri, L. E., Nugraha, R. Y. B., Aulia, R., Febriliani, F., Ariel, D. G., Mardhiyyah, K., Winarsih, S., Japany, D., Endang, E., & Waluyo, D. (2020). Non-Toxic Fractions of Streptomyces hygrosopicus Subsp. Hygrosopicus Metabolite Suppressed the Growth of Plasmodium Falciparum in Vitro Possibly through L-malate: Quinone Oxidoreductase (PfMQO) Mitochondrial Enzyme Inhibition. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(10), 524–531.
- Clarkson, C., Maharaj, V. J., Crouch, N. R., Grace, O. M., Pillay, P., Matsabisa, M. G., Bhagwandin, N., Smith, P. J., & Folb, P. I. (2004). In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2–3), 177–191. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.02.011>
- COMŞA, Ş., CÎMPEAN, A. M., & RAICA, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6).



Craig, A. G., Grau, G. E., Janse, C., Kazura, J. W., Milner, D., Barnwell, J. W., Turner, G., & Langhorne, J. (2012). The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. *PLOS Pathogens*, *8*(2), e1002401. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002401>

Dasgupta, S., Auth, T., Gov, N. S., Satchwell, T. J., Hanssen, E., Zuccala, E. S., Riglar, D. T., Toyne, A. M., Betz, T., Baum, J., & Gompper, G. (2014). Membrane-Wrapping Contributions to Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Biophysical Journal*, *107*(1), 43. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2014.05.024>

de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *16*(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2012.08.014>

Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragán, M. J., Herreros, E., & Sinden, R. E. (2013). Male and Female *Plasmodium falciparum* Mature Gametocytes Show Different Responses to Antimalarial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(7), 3268. <https://doi.org/10.1128/AAC.00325-13>

Ding, X. C., Ubben, D., & Wells, T. N. (2012). A framework for assessing the risk of resistance for anti-malarials in development. *Malaria Journal*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-292>

Dio Giovanni, A., Winarsih, S., Putri, F. F., Erwan, N. E., Putri, A. M., Cahyono, A. W., Mardhiyyah, K., Fitri, L. E., & Nugraha, R. Y. B. (2021). Compounds Profile of *Streptomyces hygrosopicus* Optimasi Kombinasi Pelarut N-Hexane dan Ethyl Acetate dari Profil Senyawa Metabolit Sekunder *Streptomyces hygrosopicus*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, *31*(3), 186–192. <http://jkb.ub.ac.id/index.php/jkb/article/view/2827>

Duarte, D., & Vale, N. (2020). New trends for antimalarial drugs: Synergism between antineoplastics and antimalarials on breast cancer cells. *Biomolecules*, *10*(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom10121623>

Ekwall, B., Silano, V., & Zucco, F. (1990). Chapter 7 - Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. *Short-Term Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects*, 75–98.

Espíndola, M. R., Varotti, F. de P., Aguiar, A. C. C., Andrade, S. N., & da Rocha, E. M. M. (2022). In vitro assessment for cytotoxicity screening of new antimalarial candidates. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *58*. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e18308>

Fitri, L. E., Alkarimah, A., Cahyono, A. W., Lady, W. N., Endharti, A. T., & Nugraha, R. Y. B. (2019a). Effect of Metabolite Extract of *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* on *Plasmodium falciparum* 3D7 in Vitro. *Iranian Journal of Parasitology*, *14*(3), 444. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v14i3.1484>

Fitri, L. E., Alkarimah, A., Cahyono, A. W., Lady, W. N., Endharti, A. T., & Nugraha, R. Y. B. (2019b). Effect of Metabolite Extract of *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* on *Plasmodium falciparum* 3D7 in Vitro. *Iranian Journal of Parasitology*, *14*(3), 444. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v14i3.1484>



Fitri, L. E., Putri, A. M., Erwan, N. E., Putri, F. F., Nugraha, R. Y. B., SARDJONO, T. W., Mardhiyyah, K., Ariel, D. G., FARATISHA, I. F. D., SUCIATI, IHSAN, B. R. P., & Winarsih, S. (2021). Antimalarial Properties of *Streptomyces hygroscopicus* subsp *Hygroscopicus* Secondary Metabolite Active Fractions: In Silico and In Vivo Analysis. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 13(01). <https://doi.org/10.31838/IJPR/2021.13.01.321>

Gabriel, H. B., Sussmann, R. A., Kimura, E. A., Alejandra, A., Rodriguez, M., Bofill Verdaguier, I., Fernandes Leite, G. C., & Katzin, A. M. (2018). Terpenes as Potential Antimalarial Drugs. *Terpenes and Terpenoids*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.75108>

Gabriel, H. B., Sussmann, R. A., Kimura, E. A., Rodriguez, A. A. M., Verdaguier, I. B., Leite, G. C. F., Katzin, A. M., Gabriel, H. B., Sussmann, R. A., Kimura, E. A., Rodriguez, A. A. M., Verdaguier, I. B., Leite, G. C. F., & Katzin, A. M. (2018). Terpenes as Potential Antimalarial Drugs. *Terpenes and Terpenoids*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.75108>

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312827/S1>

Goulart, H. R., Kimura, E. A., Peres, V. J., Couto, A. S., Duarte, F. A. A., & Katzin, A. M. (2004). Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2502. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2502-2509.2004>

Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F. H., & Duffy, P. E. (2008). Malaria: Progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1266–1276. <https://doi.org/10.1172/JCI33996>

Harvey, K. L., Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2012). A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology*, 42(6), 567–573. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2012.02.011>

Hill, R. A., & Connolly, J. D. (2015). Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 32(2), 273–327. <https://doi.org/10.1039/C4NP00101J>

Junaid, Q. O., Khaw, L. T., Mahmud, R., Ong, K. C., Lau, Y. L., Borade, P. U., Liew, J. W. K., Sivanandam, S., Wong, K. T., & Vythilingam, I. (2017). Pathogenesis of *Plasmodium berghei* ANKA infection in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental model for severe malaria. *Parasite*, 24, 38. <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2017040>

Kagan, I. A., & Flythe, M. D. (2014). Thin-layer Chromatographic (TLC) Separations and Bioassays of Plant Extracts to Identify Antimicrobial Compounds. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 85, 51411. <https://doi.org/10.3791/51411>

Kaushik, C. P., & Chahal, M. (2021). Synthesis, antimalarial and antioxidant activity of coumarin appended 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles. *Monatshefte Fur*



Chemie, 152(8), 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00706-021-02821-8>

Kemendes RI. (2017). Pedoman Teknis Pemeriksaan Malaria. In *Direktorat Pencegahan dan Pengendalian Penyakit*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. www.ppppl.depkes.go.id/

Kemendes RI. (2021). *Wilayah-wilayah Endemis Malaria Tinggi di Indonesia | Malaria.id*. Malaria.id. Kementerian Kesehatan RI. <https://www.malaria.id/artikel/wilayah-wilayah-endemis-malaria-tinggi-di-indonesia>

Kifle, Z. D., Adinew, G. M., Mengistie, M. G., Gurmu, A. E., Enyew, E. F., Goshu, B. T., & Amare, G. G. (2020). Evaluation of Antimalarial Activity of Methanolic Root Extract of *Myrica salicifolia* A Rich (Myricaceae) Against Plasmodium berghei-Infected Mice. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 25. <https://doi.org/10.1177/2515690X20920539>

Lange, S. S., Takata, K. I., & Wood, R. D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 11(2), 96. <https://doi.org/10.1038/NRC2998>

Lee, W. C., Cheong, F. W., Amir, A., Lai, M. Y., Tan, J. H., Phang, W. K., Shahari, S., & Lau, Y. L. (2022). Plasmodium knowlesi: the game changer for malaria eradication. *Malaria Journal* 2022 21:1, 21(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/S12936-022-04131-8>

Lekana-Douki, J., Oyegue Liabagui, S., Bongui, J., Zatra, R., Lebibi, J., & Toure-Ndougou, F. S. (2011). In vitro antiplasmodial activity of crude extracts of *Tetrapleura tetraptera* and *Copaifera religiosa*. *BMC Research Notes*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-506/TABLES/2>

Lima, S. M. A., Melo, J. G. S., Militão, G. C. G., Araújo, R. M., Braz-filho, R., Marchand, P., Araújo, J. M., & Silva, T. G. (2016). Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil). *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7886-9>

Mabeta, P., Pavić, K., & Zorc, B. (2018). Insights into the mechanism of antiproliferative effects of primaquine-cinnamic acid conjugates on MCF-7 cells. *Acta Pharmaceutica*, 68(3), 337–348. <https://doi.org/10.2478/acph-2018-0021>

Maji, A. K. (2018). Drug susceptibility testing methods of antimalarial agents. *Tropical Parasitology*, 8(2), 70. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.248695>

Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology* 2013 11:10, 11(10), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>

Mhlwatika, Z., & Aderibigbe, B. A. (2018). Polymeric nanocarriers for the delivery of antimalarials. *Molecules*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23102527>

Milner, D. A. J. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025569>



Mons, B. (1986). Intra erythrocytic differentiation of *Plasmodium berghei*. *Acta Leidensia*, 54, 1–124. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3538746/>

Moon, H. I., Lee, J. H., Lee, Y. C., & Kim, K. S. (2011). Antiplasmodial and cytotoxic activity of coumarin derivatives from dried roots of *Angelica gigas* Nakai in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(4), 663–666. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.559248>

Nugraha, R. Y. B., Alkarimah, A., Ramadhani, Cahyono, A. W., Laksmi, D., Winarsih, S., & Fitri, L. E. (2013). Metabolite extract of *Streptomyces hygroscopicus* *Hygroscopicus* inhibit the growth of *Plasmodium berghei* through inhibition of ubiquitin – proteasome system. *Tropical Biomedicine*, 30(2), 291–300.

Nugraha, R. Y. B., Faratisha, I. F. D., Mardhiyyah, K., Ariel, D. G., Putri, F. F., Nafisatuzzamrudah, Winarsih, S., Sardjono, T. W., & Fitri, L. E. (2020). Antimalarial Properties of Isoquinoline Derivative from *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Hygroscopicus*: An in Silico Approach. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6135696>

Nureye, D., Sano, M., Fekadu, M., Duguma, T., & Tekalign, E. (2021). *Antiplasmodial Activity of the Crude Extract and Solvent Fractions of Stem Barks of Gardenia ternifolia in Plasmodium berghei -Infected Mice*. 2021.

Ogbeide, O. K., Dickson, V. O., Jebba, R. D., Owahiroro, D. A., Olaoluwa, M. O., Imieje, V. O., Erharuyi, O., Owolabi, B. J., Fasinu, P. S., & Falodun, A. (2018). Antiplasmodial and Acute Toxicity Studies of Fractions and Cassane-Type Diterpenoids from the Stem Bark of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 2(4), 179–184. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v2i4.5>

Onambele, L. A., Riepl, H., Fischer, R., Pradel, G., Prokop, A., & Aminake, M. N. (2015). Synthesis and evaluation of the antiplasmodial activity of tryptanthrin derivatives. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(2), 48–57. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPDR.2015.03.002>

Parasuraman, S. (2011a). Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2), 74. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>

Parasuraman, S. (2011b). Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2), 74. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>

Pathania, A. S., Kumar, S., Guru, S. K., Bhushan, S., Sharma, P. R., Aithagani, S. K., Singh, P. P., Vishwakarma, R. A., Kumar, A., & Malik, F. (2014). The Synthetic Tryptanthrin Analogue Suppresses STAT3 Signaling and Induces Caspase Dependent Apoptosis via ERK Up Regulation in Human Leukemia HL-60 Cells. *PLOS ONE*, 9(11), e110411. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0110411>

Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J. S., & Mazurek, A. P. (2005). In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. *Cancer Letters*, 229(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2005.01.014>

Powers, J. M., & Ronald L. Sakaguchi. (2012). Biocompatibility and Tissue



Reaction to Biomaterials. *Craig's Restorative Dental Materials*, 109–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08108-5.10006-4>

Pudjiastuti, P., Rosmawaty, Sumarsih, S., Arwati, H., Nugraha, A. S., & Fitri, L. E. (2015). In vitro study of parasitemia determination of alkaloids from *S. tuberosa* Lour by flow cytometry in comparison with optical microscopy. *Der Pharma Chemica*, 7(10), 372–376. <https://www.derpharmachemica.com/abstract/in-vitro-study-of-parasitemia-determination-of-alkaloids-from-s-tuberosa-lour-by-flow-cytometry-in-comparison-with-opti-4134.html>

Putta, S., Sastry Yarla, N., Kumar Kilari, E., Surekha, C., Aliev, G., Basavaraju Divakara, M., Sridhar Santosh, M., Ramu, R., Zameer, F., Prasad MN, N., Chintala, R., Vijaya Rao, P., Shiralgi, Y., & Lakkappa Dhananjaya, B. (2016). Therapeutic Potentials of Triterpenes in Diabetes and its Associated Complications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(23), 2532–2542. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160414123343>

Raz, A. (2022). Plasmodium berghei Infection in BALB/c Mice Model as an Animal Model for Malaria Disease Research. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2410, 589–595. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1884-4_31

Rivo, Y. B., Alkarimah, A., Ramadhani, N. N., Cahyono, A. W., Laksmi, D. A., & Fitri, L. E. (2013). Metabolite extract of *Streptomyces hygroscopicus* Hygroscopicus inhibit the growth of *Plasmodium berghei* through inhibition of ubiquitin-proteasome system. *Tropical Biomedicine*, 30(2), 291–300.

Saeed, S., Tremp, A. Z., Sharma, V., Lasonder, E., & Dessens, J. T. (2020). NAD(P) transhydrogenase has vital non-mitochondrial functions in malaria parasite transmission. *EMBO Reports*, 21(3), e47832. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201947832>

Sandy, S., Harisma, I., & Sasto, S. (2020). Inhibition of secondary metabolite extract of *Streptomyces* sp. on *Plasmodium falciparum* in vitro: A study of soil sediment of Papua's Hamadi mangrove forest. *JKKI : Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 11(1), 34–43. <https://doi.org/10.20885/JKKI.VOL11.ISS1.ART6>

Schmidt, C. Q., Kennedy, A. T., & Tham, W. H. (2015). More than just immune evasion: Hijacking complement by *Plasmodium falciparum*. *Molecular Immunology*, 67(1), 71–84. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2015.03.006>

Setyaningrum, E., Arifiyanto, A., Nukmal, N., Aeny, T. N., Putri, M. handerlin, & Setiawati, U. N. mah. (2021). In vitro Test for Inhibition of *Plasmodium falciparum* 3D7 Parasites using *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* Strain i18, Isolated from a Pineapple Farm in Lampung. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(2), 891–896. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.2.45>

Silano, V., PAGANUZZI-STAMMATI, A., & Zucco, F. (2005). *Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures*.

Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta*



Histochemica, 120(3), 159–167.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2018.02.005>

Suberu, J. O., Romero-Canelón, I., Sullivan, N., Lapkin, A. A., & Barker, G. C. (2014). Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF7 breast cancer cells. *ChemMedChem*, 9(12), 2791–2797.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201402285>

Susidarti, R. A. (2014). IN VITRO ANTIPLASMODIAL ACTIVITY OF COUMARIN 8-HYDROXYISOCAPNOLACTONE-2',3'-DIOL ISOLATED FROM *Micromelum minutum* (G. Forst.) Wight & Arn. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 25(1), 44. <https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm25iss1pp44>

Talapko, J., Škrlec, I., Alebić, T., Jukić, M., & Včev, A. (2019). Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*, 7(6).
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7060179>

Tanjung, M., Saputri, R. D., Fitriati, F. F., & Tjahjandarie, T. S. (2016). Antimalarial and Antioxidant Activities of Isoprenylated Coumarins from the Stem Bark of *Mesua borneensis* L. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6(2), 95–100. <https://doi.org/10.1080/22311866.2016.1188726>

Thu, A. M., Phyo, A. P., Landier, J., Parker, D. M., & Nosten, F. H. (2017). Combating multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *The Febs Journal*, 284(16), 2569. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14127>

Trasia, R. F. (2021). Use of Combination Therapy in Malaria Treatment and Prevention in Indonesia. *Journal of Pharmaceutical And Sciences*, 4(1), 29–33. <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v4i1.61>

Tucker, A. M., & Grundt, P. (2012). The chemistry of tryptanthrin and its derivatives. *Arkivoc*, 2012(1), 546–569. <https://doi.org/10.3998/ARK.5550190.0013.113>

Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., & Marti, M. (2020a). Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology* 2020 18:3, 18(3), 177–189.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>

Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., & Marti, M. (2020b). Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology* 2020 18:3, 18(3), 177–189.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>

Violita, M., Widyastuti, A., Astami, C. P., Brian Nugraha, R. Y., & Khasanah, U. (2021). Exploration of *Streptomyces hygroscopicus* Secondary Metabolite Compound as a Development of Antimalarial Drug Candidate. *Pharmacognosy Communications*, 12(1), 2–6.
<https://doi.org/10.5530/PC.2022.1.2>

Waksman, & Henrici. (1948). *Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus* (Jensen 1931). *Europeana*.
<https://www.europeana.eu/en/item/11637/PROKARYAXDSMZXGERMANYXDSMX41912>



WHO. (2021). *More malaria cases and deaths in 2020 linked to COVID-19 disruptions*. <https://www.who.int/news/item/06-12-2021-more-malaria-cases-and-deaths-in-2020-linked-to-covid-19-disruptions>

Widyawati. (2021). *Tren Kasus Malaria Menurun – Sehat Negeriku*. Biro Komunikasi Dan Pelayanan Masyarakat, Kementerian Kesehatan RI. <https://sehatnegeriku.kemkes.go.id/baca/rilis-media/20210423/3337549/tren-kasus-malaria-menurun/>

Yang, Y. Z., Ranz, A., Pan, H. Z., Zhang, Z. N., Lin, X. B., & Meshnick, S. R. (1992). Daphnetin: a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(1), 15–20. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1992.46.15>

Ziegler, H. L., Franzyk, H., Sairafianpour, M., Tabatabai, M., Tehrani, M. D., Bagherzadeh, K., Hägerstrand, H., Stærk, D., & Jaroszewski, J. W. (2004). Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: Structure-activity relationships for betulinic acid analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12(1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2003.10.010>

Zin, N. N. I. N. M., Mohamad, M. N., Roslan, K., Sazeli, A. W., Moin, N. I. A., Alias, A., Zakaria, Y., & Abu-Bakar, N. (2020). In vitro antimalarial and toxicological activities of quercus infectoria (Olivier) gall extracts. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 27(4), 36–50. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.4.4>



Lampiran 1. Etik Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

"Ethical Approval Letter"

No. 13 / EC / KEPK / 01 / 2022

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MELAKUKAN KAJI ETIK DENGAN SEKSAMA BERDASARKAN PEDOMAN DEKLARASI HELSINKI TERHADAP PROTOKOL PENELITIAN BERIKUT INI:

Health Research Ethics Committee Faculty of Medicine Brawijaya University after conducting an ethical review based on The Declaration of Helsinki toward the following research protocol:

JUDUL : Uji Efektivitas Anti Malaria dan Toksisitas Fraksi Nomor 12, 13, 14, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 54, 55, dan 56 Metabolit Sekunder Bakteri *Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus* secara *In Vitro*.

PENELITI UTAMA : Prof . Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes, Sp.Park
Principle Investigator

PENELITI LAIN : Prof. Dr. Dra. Sri Winarsih., Apt, M.SI
Other Investigators
Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D
dr. Hikmawan Wahyu Sulistomo, Ph.D
Mutlana Nor Afifah
Mahya Nailul 'Azizah
Fadilah Istiapalja
Hafsha Yasmina Abidah
Alif Raudhah Husnul Khotimah

INSTITUSI : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
Institution

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
Place of research

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PROTOKOL TERSEBUT DISETUJUI, KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK INI BERLAKU SEJAK 12 Januari 2022 HINGGA 12 Januari 2023.

Hereby declares that the protocol is approved. This ethical approval is valid from 12 January 2022 until 12 January 2023.

Malang,
Chairman,



Prof. Dr. dr. Much. Istiadhi, Sp.S, Sp.BS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246051611000

Keterangan/ Notes :

Laporan perkembangan dan hasil penelitian harus diserahkan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan
The progress and final report of the study should be submitted to the Health Research Ethics Committee

Jika ada perubahan atau penyimpangan protokol dan/ atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian

If there be any protocol modification or deviation and/or extension of the study, the Principal Investigator is required to resubmit the protocol for approval.

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD) harus segera dilaporkan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan
If there are Serious Adverse Events (SAE) should be immediately reported to the Health Research Ethics Committee



Lampiran 2. Analisis Statistik Uji Efektivitas Fraksi 33K terhadap *P. berghei*

2.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fraksi 33K	.119	21	.200*	.988	21	.994

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Fraksi 33K	Based on Mean	1.696	6	14	.194
	Based on Median	.677	6	14	.671
	Based on Median and with adjusted df	.677	6	9.255	.673
	Based on trimmed mean	1.615	6	14	.215

2.3 Uji ANOVA

ANOVA

Fraksi 33K

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6321.219	6	1053.536	76.648	.000
Within Groups	192.433	14	13.745		
Total	6513.651	20			

2.4 Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fraksi 33K

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.25 µg/ml	1.25 µg/ml	-16.37667*	3.02712	.001	-26.7130	-6.0403
	6.25 µg/ml	-24.47333*	3.02712	.000	-34.8097	-14.1370
	31.25 µg/ml	-30.32667*	3.02712	.000	-40.6630	-19.9903
	156.25 µg/ml	-34.71000*	3.02712	.000	-45.0464	-24.3736
	K+	-39.13333*	3.02712	.000	-49.4697	-28.7970
	K-	11.47667*	3.02712	.025	1.1403	21.8130



1.25 µg/ml	0.25 µg/ml	16.37667*	3.02712	.001	6.0403	26.7130
	6.25 µg/ml	-8.09667	3.02712	.176	-18.4330	2.2397
	31.25 µg/ml	-13.95000*	3.02712	.006	-24.2864	-3.6136
	156.25 µg/ml	-18.33333*	3.02712	.000	-28.6697	-7.9970
	K+	-22.75667*	3.02712	.000	-33.0930	-12.4203
	K-	27.85333*	3.02712	.000	17.5170	38.1897
6.25 µg/ml	0.25 µg/ml	24.47333*	3.02712	.000	14.1370	34.8097
	1.25 µg/ml	8.09667	3.02712	.176	-2.2397	18.4330
	31.25 µg/ml	-5.85333	3.02712	.492	-16.1897	4.4830
	156.25 µg/ml	-10.23667	3.02712	.053	-20.5730	.0997
	K+	-14.66000*	3.02712	.004	-24.9964	-4.3236
	K-	35.95000*	3.02712	.000	25.6136	46.2864
31.25 µg/ml	0.25 µg/ml	30.32667*	3.02712	.000	19.9903	40.6630
	1.25 µg/ml	13.95000*	3.02712	.006	3.6136	24.2864
	6.25 µg/ml	5.85333	3.02712	.492	-4.4830	16.1897
	156.25 µg/ml	-4.38333	3.02712	.769	-14.7197	5.9530
	K+	-8.80667	3.02712	.120	-19.1430	1.5297
	K-	41.80333*	3.02712	.000	31.4670	52.1397
156.25 µg/ml	0.25 µg/ml	34.71000*	3.02712	.000	24.3736	45.0464
	1.25 µg/ml	18.33333*	3.02712	.000	7.9970	28.6697
	6.25 µg/ml	10.23667	3.02712	.053	-.0997	20.5730
	31.25 µg/ml	4.38333	3.02712	.769	-5.9530	14.7197
	K+	-4.42333	3.02712	.762	-14.7597	5.9130
	K-	46.18667*	3.02712	.000	35.8503	56.5230
K+	0.25 µg/ml	39.13333*	3.02712	.000	28.7970	49.4697
	1.25 µg/ml	22.75667*	3.02712	.000	12.4203	33.0930
	6.25 µg/ml	14.66000*	3.02712	.004	4.3236	24.9964
	31.25 µg/ml	8.80667	3.02712	.120	-1.5297	19.1430
	156.25 µg/ml	4.42333	3.02712	.762	-5.9130	14.7597
	K-	50.61000*	3.02712	.000	40.2736	60.9464
K-	0.25 µg/ml	-11.47667*	3.02712	.025	-21.8130	-1.1403
	1.25 µg/ml	-27.85333*	3.02712	.000	-38.1897	-17.5170
	6.25 µg/ml	-35.95000*	3.02712	.000	-46.2864	-25.6136
	31.25 µg/ml	-41.80333*	3.02712	.000	-52.1397	-31.4670
	156.25 µg/ml	-46.18667*	3.02712	.000	-56.5230	-35.8503
	K+	-50.61000*	3.02712	.000	-60.9464	-40.2736

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2.5 Uji Korelasi Pearson

Correlations

		Fraksi 33K	Konsentrasi
Fraksi 33K	Pearson Correlation	1	.931**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
Konsentrasi	Pearson Correlation	.931**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	21

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

2.6 Uji Regresi Linier

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.931 ^a	.866	.856	4.97190

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2085.167	1	2085.167	84.352	.000 ^b
	Residual	321.357	13	24.720		
	Total	2406.524	14			

a. Dependent Variable: Fraksi 33K

b. Predictors: (Constant), Konsentrasi

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7.643	3.011		2.539	.025
	Konsentrasi	8.337	.908	.931	9.184	.000

a. Dependent Variable: Fraksi 33K



Lampiran 3. Analisis Statistik Uji Efektivitas Fraksi 35K terhadap *P. berghei*

2.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fraksi 35K	.119	21	.200*	.972	21	.781

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Fraksi 35K	Based on Mean	2.423	6	14	.081
	Based on Median	.600	6	14	.726
	Based on Median and with adjusted df	.600	6	7.506	.725
	Based on trimmed mean	2.236	6	14	.101

2.3 Uji ANOVA

ANOVA

Fraksi 35K

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5788.463	6	964.744	91.128	.000
Within Groups	148.213	14	10.587		
Total	5936.676	20			

2.4 Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fraksi 35K

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.25 µg/ml	1.25 µg/ml	-8.82333	2.65665	.059	-17.8947	.2480
	6.25 µg/ml	-12.83333*	2.65665	.004	-21.9047	-3.7620
	31.25 µg/ml	-22.45333*	2.65665	.000	-31.5247	-13.3820
	156.25 µg/ml	-32.87667*	2.65665	.000	-41.9480	-23.8053
	K+	-38.55000*	2.65665	.000	-47.6214	-29.4786



1.25 µg/ml	K-	12.06000*	2.65665	.007	2.9886	21.1314
	0.25 µg/ml	8.82333	2.65665	.059	-.2480	17.8947
	6.25 µg/ml	-4.01000	2.65665	.736	-13.0814	5.0614
	31.25 µg/ml	-13.63000*	2.65665	.002	-22.7014	-4.5586
	156.25 µg/ml	-24.05333*	2.65665	.000	-33.1247	-14.9820
	K+	-29.72667*	2.65665	.000	-38.7980	-20.6553
6.25 µg/ml	K-	20.88333*	2.65665	.000	11.8120	29.9547
	0.25 µg/ml	12.83333*	2.65665	.004	3.7620	21.9047
	1.25 µg/ml	4.01000	2.65665	.736	-5.0614	13.0814
	31.25 µg/ml	-9.62000*	2.65665	.035	-18.6914	-.5486
	156.25 µg/ml	-20.04333*	2.65665	.000	-29.1147	-10.9720
	K+	-25.71667*	2.65665	.000	-34.7880	-16.6453
31.25 µg/ml	K-	24.89333*	2.65665	.000	15.8220	33.9647
	0.25 µg/ml	22.45333*	2.65665	.000	13.3820	31.5247
	1.25 µg/ml	13.63000*	2.65665	.002	4.5586	22.7014
	6.25 µg/ml	9.62000*	2.65665	.035	.5486	18.6914
	156.25 µg/ml	-10.42333*	2.65665	.020	-19.4947	-1.3520
	K+	-16.09667*	2.65665	.000	-25.1680	-7.0253
156.25 µg/ml	K-	34.51333*	2.65665	.000	25.4420	43.5847
	0.25 µg/ml	32.87667*	2.65665	.000	23.8053	41.9480
	1.25 µg/ml	24.05333*	2.65665	.000	14.9820	33.1247
	6.25 µg/ml	20.04333*	2.65665	.000	10.9720	29.1147
	31.25 µg/ml	10.42333*	2.65665	.020	1.3520	19.4947
	K+	-5.67333	2.65665	.385	-14.7447	3.3980
K+	K-	44.93667*	2.65665	.000	35.8653	54.0080
	0.25 µg/ml	38.55000*	2.65665	.000	29.4786	47.6214
	1.25 µg/ml	29.72667*	2.65665	.000	20.6553	38.7980
	6.25 µg/ml	25.71667*	2.65665	.000	16.6453	34.7880
	31.25 µg/ml	16.09667*	2.65665	.000	7.0253	25.1680
	156.25 µg/ml	5.67333	2.65665	.385	-3.3980	14.7447
K-	K-	50.61000*	2.65665	.000	41.5386	59.6814
	0.25 µg/ml	-12.06000*	2.65665	.007	-21.1314	-2.9886
	1.25 µg/ml	-20.88333*	2.65665	.000	-29.9547	-11.8120
	6.25 µg/ml	-24.89333*	2.65665	.000	-33.9647	-15.8220
	31.25 µg/ml	-34.51333*	2.65665	.000	-43.5847	-25.4420
	156.25 µg/ml	-44.93667*	2.65665	.000	-54.0080	-35.8653
	K+	-50.61000*	2.65665	.000	-59.6814	-41.5386

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2.5 Uji Korelasi Pearson

Correlations

		Fraksi 35K	Konsentrasi
Fraksi 35K	Pearson Correlation	1	.962**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
Konsentrasi	Pearson Correlation	.962**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	21

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

2.6 Uji Regresi Linier

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.962 ^a	.926	.921	3.40410

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1890.514	1	1890.514	163.145	.000 ^b
	Residual	150.643	13	11.588		
	Total	2041.157	14			

a. Dependent Variable: Fraksi 35K

b. Predictors: (Constant), Konsentrasi

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.642	2.061		1.767	.101
	Konsentrasi	7.938	.622	.962	12.773	.000

a. Dependent Variable: Fraksi 35K



Lampiran 4. Analisis Statistik Uji Efektivitas Fraksi 36K terhadap *P. berghei*

2.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fraksi 36K	.119	21	.200*	.977	21	.869

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Fraksi 36K	Based on Mean	2.750	6	14	.056
	Based on Median	.431	6	14	.846
	Based on Median and with adjusted df	.431	6	7.125	.838
	Based on trimmed mean	2.432	6	14	.080

2.3 Uji ANOVA

ANOVA

Fraksi 36K

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7736.207	6	1289.368	178.953	.000
Within Groups	100.871	14	7.205		
Total	7837.078	20			

2.4 Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fraksi 36K

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.25 µg/ml	1.25 µg/ml	-1.59333	2.19166	.988	-9.0769	5.8903
	6.25 µg/ml	-4.65000	2.19166	.392	-12.1336	2.8336
	31.25 µg/ml	-19.89000*	2.19166	.000	-27.3736	-12.4064
	156.25 µg/ml	-42.66000*	2.19166	.000	-50.1436	-35.1764



1.25 µg/ml	K+	-40.91667*	2.19166	.000	-48.4003	-33.4331
	K-	9.69333*	2.19166	.008	2.2097	17.1769
	0.25 µg/ml	1.59333	2.19166	.988	-5.8903	9.0769
	6.25 µg/ml	-3.05667	2.19166	.796	-10.5403	4.4269
	31.25 µg/ml	-18.29667*	2.19166	.000	-25.7803	-10.8131
	156.25 µg/ml	-41.06667*	2.19166	.000	-48.5503	-33.5831
	K+	-39.32333*	2.19166	.000	-46.8069	-31.8397
6.25 µg/ml	K-	11.28667*	2.19166	.002	3.8031	18.7703
	0.25 µg/ml	4.65000	2.19166	.392	-2.8336	12.1336
	1.25 µg/ml	3.05667	2.19166	.796	-4.4269	10.5403
	31.25 µg/ml	-15.24000*	2.19166	.000	-22.7236	-7.7564
	156.25 µg/ml	-38.01000*	2.19166	.000	-45.4936	-30.5264
	K+	-36.26667*	2.19166	.000	-43.7503	-28.7831
31.25 µg/ml	K-	14.34333*	2.19166	.000	6.8597	21.8269
	0.25 µg/ml	19.89000*	2.19166	.000	12.4064	27.3736
	1.25 µg/ml	18.29667*	2.19166	.000	10.8131	25.7803
	6.25 µg/ml	15.24000*	2.19166	.000	7.7564	22.7236
	156.25 µg/ml	-22.77000*	2.19166	.000	-30.2536	-15.2864
	K+	-21.02667*	2.19166	.000	-28.5103	-13.5431
156.25 µg/ml	K-	29.58333*	2.19166	.000	22.0997	37.0669
	0.25 µg/ml	42.66000*	2.19166	.000	35.1764	50.1436
	1.25 µg/ml	41.06667*	2.19166	.000	33.5831	48.5503
	6.25 µg/ml	38.01000*	2.19166	.000	30.5264	45.4936
	31.25 µg/ml	22.77000*	2.19166	.000	15.2864	30.2536
	K+	1.74333	2.19166	.982	-5.7403	9.2269
K+	K-	52.35333*	2.19166	.000	44.8697	59.8369
	0.25 µg/ml	40.91667*	2.19166	.000	33.4331	48.4003
	1.25 µg/ml	39.32333*	2.19166	.000	31.8397	46.8069
	6.25 µg/ml	36.26667*	2.19166	.000	28.7831	43.7503
	31.25 µg/ml	21.02667*	2.19166	.000	13.5431	28.5103
	156.25 µg/ml	-1.74333	2.19166	.982	-9.2269	5.7403
K-	K-	50.61000*	2.19166	.000	43.1264	58.0936
	0.25 µg/ml	-9.69333*	2.19166	.008	-17.1769	-2.2097
	1.25 µg/ml	-11.28667*	2.19166	.002	-18.7703	-3.8031
	6.25 µg/ml	-14.34333*	2.19166	.000	-21.8269	-6.8597
	31.25 µg/ml	-29.58333*	2.19166	.000	-37.0669	-22.0997
	156.25 µg/ml	-52.35333*	2.19166	.000	-59.8369	-44.8697
	K+	-50.61000*	2.19166	.000	-58.0936	-43.1264

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2.5 Uji Korelasi Pearson

Correlations

		Fraksi 36K	Konsentrasi
Fraksi 36K	Pearson Correlation	1	.903**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
Konsentrasi	Pearson Correlation	.903**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	21

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

2.6 Uji Regresi Linier

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.903 ^a	.816	.802	7.47186

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3220.924	1	3220.924	57.693	.000 ^b
	Residual	725.773	13	55.829		
	Total	3946.697	14			

a. Dependent Variable: Fraksi 36K

b. Predictors: (Constant), Konsentrasi

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-7.633	4.524		-1.687	.115
	Konsentrasi	10.362	1.364	.903	7.596	.000

a. Dependent Variable: Fraksi 36K



Lampiran 5. Analisis Statistik Uji Toksisitas Fraksi 36K terhadap *P. berghei*

2.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Toksisitas 36K	.167	18	.200*	.939	18	.274

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Toksisitas 36K	Based on Mean	2.144	5	12	.130
	Based on Median	.636	5	12	.676
	Based on Median and with adjusted df	.636	5	8.177	.679
	Based on trimmed mean	1.997	5	12	.151

2.3 Uji ANOVA

ANOVA

Toksisitas 36K

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1012.822	5	202.564	8.926	.001
Within Groups	272.327	12	22.694		
Total	1285.149	17			

2.4 Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Toksisitas 36K

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,25 µg/ml	2,5 µg/ml	-9.10333	3.88964	.251	-22.1683	3.9616
	25 µg/ml	-8.32333	3.88964	.330	-21.3883	4.7416
	250 µg/ml	-9.88667	3.88964	.186	-22.9516	3.1783
	2500 µg/ml	-16.91000*	3.88964	.009	-29.9750	-3.8450
	K (-)	6.37000	3.88964	.592	-6.6950	19.4350
2,5 µg/ml	0,25 µg/ml	9.10333	3.88964	.251	-3.9616	22.1683



	25 µg/ml	.78000	3.88964	1.000	-12.2850	13.8450
	250 µg/ml	-.78333	3.88964	1.000	-13.8483	12.2816
	2500 µg/ml	-7.80667	3.88964	.392	-20.8716	5.2583
	K (-)	15.47333*	3.88964	.018	2.4084	28.5383
25 µg/ml	0,25 µg/ml	8.32333	3.88964	.330	-4.7416	21.3883
	2,5 µg/ml	-.78000	3.88964	1.000	-13.8450	12.2850
	250 µg/ml	-1.56333	3.88964	.998	-14.6283	11.5016
	2500 µg/ml	-8.58667	3.88964	.302	-21.6516	4.4783
	K (-)	14.69333*	3.88964	.025	1.6284	27.7583
250 µg/ml	0,25 µg/ml	9.88667	3.88964	.186	-3.1783	22.9516
	2,5 µg/ml	.78333	3.88964	1.000	-12.2816	13.8483
	25 µg/ml	1.56333	3.88964	.998	-11.5016	14.6283
	2500 µg/ml	-7.02333	3.88964	.497	-20.0883	6.0416
	K (-)	16.25667*	3.88964	.013	3.1917	29.3216
2500 µg/ml	0,25 µg/ml	16.91000*	3.88964	.009	3.8450	29.9750
	2,5 µg/ml	7.80667	3.88964	.392	-5.2583	20.8716
	25 µg/ml	8.58667	3.88964	.302	-4.4783	21.6516
	250 µg/ml	7.02333	3.88964	.497	-6.0416	20.0883
	K (-)	23.28000*	3.88964	.001	10.2150	36.3450
K (-)	0,25 µg/ml	-6.37000	3.88964	.592	-19.4350	6.6950
	2,5 µg/ml	-15.47333*	3.88964	.018	-28.5383	-2.4084
	25 µg/ml	-14.69333*	3.88964	.025	-27.7583	-1.6284
	250 µg/ml	-16.25667*	3.88964	.013	-29.3216	-3.1917
	2500 µg/ml	-23.28000*	3.88964	.001	-36.3450	-10.2150

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 6. Analisis Probit Uji Efektivitas Fraksi 36K terhadap *P. berghei*

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Fraksi 36K			95% Confidence Limits for log(Fraksi 36K) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	.011	.000	.363	-1.945	-44.121	-.440
	.020	.034	.000	.672	-1.467	-36.729	-.173
	.030	.069	.000	1.004	-1.164	-32.044	.002
	.040	.116	.000	1.370	-.936	-28.524	.137
	.050	.178	.000	1.776	-.750	-25.663	.249
	.060	.256	.000	2.232	-.593	-23.231	.349
	.070	.352	.000	2.748	-.454	-21.103	.439
	.080	.468	.000	3.335	-.330	-19.200	.523
	.090	.606	.000	4.009	-.217	-17.473	.603
	.100	.770	.000	4.793	-.114	-15.887	.681
	.150	2.071	.000	11.925	.316	-9.396	1.076
	.200	4.547	.000	45.179	.658	-4.501	1.655
	.250	8.928	.063	1129.093	.951	-1.203	3.053
	.300	16.364	1.415	824180.798	1.214	.151	5.916
	.350	28.690	4.528	2082330036.198	1.458	.656	9.319
	.400	48.877	8.656	5560055199233.784	1.689	.937	12.745
	.450	81.838	13.845	13445915399145786.000	1.913	1.141	16.129
	.500	135.913	20.463	30868112271463280.000.000	2.133	1.311	19.490
	.550	225.719	29.086	73687145331786905.000000.000	2.354	1.464	22.867
	.600	377.939	40.582	20427963407444213.0000000000.000	2.577	1.608	26.310
.650	643.863	56.316	75140961510425760.000000000000.000	2.809	1.751	29.876	
.700	1128.817	78.567	43539545506554774.0000000000000000.000	3.053	1.895	33.639	
.750	2068.975	111.437	5.059E+37	3.316	2.047	37.704	
.800	4062.230	163.077	1.716E+42	3.609	2.212	42.234	
.850	8918.724	252.186	3.300E+47	3.950	2.402	47.519	
.900	23990.306	432.826	1.482E+54	4.380	2.636	54.171	
.910	30466.975	492.626	5.998E+55	4.484	2.693	55.778	
.920	39499.076	566.775	3.343E+57	4.597	2.753	57.524	



.930	52549.666	660.974	2.782E+59	4.721	2.820	59.444
.940	72283.566	784.435	3.882E+61	4.859	2.895	61.589
.950	103983.609	953.114	1.085E+64	5.017	2.979	64.035
.960	159406.788	1197.404	8.124E+66	5.203	3.078	66.910
.970	269529.945	1583.801	2.779E+70	5.431	3.200	70.444
.980	541784.418	2294.184	1.388E+75	5.734	3.361	75.142
.990	1628313.239	4104.621	3.537E+82	6.212	3.613	82.549

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.



RIWAYAT HIDUP

Alif Raudhah Husnul Khotimah, lahir di Malang, 17 Juni 1997. Putri dari Bapak Sugiyanto dan Ibu Endah Asnawati. Penulis telah menyelesaikan pendidikan di SDN Sitirejo 1 Wagir, SMPN 1 Malang, SMAN 1 Malang, Pendidikan Dokter UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, serta saat ini sedang menempuh Profesi Dokter UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pada tahun yang sama, penulis mengambil Program Magister Ilmu Biomedik *Fasttrack* Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia
Telp. +62341 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192, Fax. +62341 565420
E-mail : sekr.fk@ub.ac.id <http://fk.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN

Nomor 17 /UN10.F08.08/ PK.03.08.3/2023

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med).
NIP/NIK : 2012018705212001
pangkat dan golongan : Penata Muda Tk. I, III/b
jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,


nama : Alif Raudhah Husnul Khotimah
nim : 206070117111012
program studi : Magister Ilmu Biomedik
judul : Uji Efektivitas dan Toksisitas Antimalaria Fraksi Nomor 33K, 35K dan 36K Metabolit Sekunder *Streptomyces hygroscopicus subsp. Hygroscopicus* secara In Vitro
jenis Artikel : Tesis
jumlah halaman : 72

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah tersebut diatas memiliki **kemiripan 4%**.

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 11 Januari 2023

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,


dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med).
NIK 2012018705212001

