

UJI AKTIVITAS ANTIPLASMODIUM FRAKSI 12 (FG12) EKSTRAK METANOL DAUN KAPUR (*Harmsipanax aculeatus* Harms)

Rachel Turalely

Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Pattimura

Email: ache_q3a@yahoo.com

Diterima 15 Januari 2018/Disetujui 21 Februari 2018

ABSTRAK

Daun kapur (*Harmsipanax aculeatus* Harms) merupakan tanaman tradisoanal dari Maluku yang digunakan secara turun temurun untuk mengobati malaria. Secara ilmiah, ekstrak daun kapur telah diujikan aktivitas antiplasmodium secara *in vivo* dan *in vitro*. Ekstrak metanol daun kapur secara *in vivo* maupun *in vitro* telah terbukti memiliki aktivitas antiplasmodium sehingga berpotensi dikembangkan untuk mencari senyawa aktif antimalaria. Ekstrak metanol daun kapur telah dipisahkan lebih lanjut dengan *vacuum liquid chromatography* dan dimonitoring dengan *thin layer chromatography* sehingga diperoleh 12 fraksi. Fraksi 12 ekstrak metanol larut dalam metanol. Namun aktivitas sebagai antiplasmodium belum pernah dilaporkan. Penelitian ini menjelaskan tentang aktivitas antiplasmodium FG12 ekstrak metanol. Uji aktivitas antiplasmodium dilakukan secara *in vitro* dan persentase penghambatan parasitemia yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis regresi probit menggunakan SPSS sehingga dapat diperoleh nilai IC_{50} . Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC_{50} FG12 sebesar 3,88 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} ini menunjukkan bahwa FG12 ekstrak metanol daun kapur memiliki aktivitas antiplasmodium paling baik dan berpotensi dikembangkan untuk mencari dan menemukan senyawa aktif antimalaria dari daun kapur.

Kata Kunci : Aktivitas antiplasmodium *in vitro*, FG12, IC_{50} .

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang menyerang manusia yang disebabkan oleh *Plasmodium*. *Plasmodium* yang banyak ditemukan di Indonesia adalah *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale*. Diantara keempat *Plasmodium* tersebut, yang paling banyak menyebabkan kesakitan dan kematian adalah *Plasmodium falciparum* karena dapat menyebabkan komplikasi yang berat (Harjanto, 2000).

Saat ini malaria menjadi fokus perhatian dunia karena angka kesakitan dan kematian yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* sangat tinggi. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa tingkat penderita malaria di dunia mencapai 300-500 juta orang (Chowdurry dan Bagasra, 2007) dengan tingkat kematian 2-3 juta orang/tahun (Dua *et al.*, 2004). Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) tahun 2009 dan *Global Malaria Action Plan* 3,3 milyar orang (setengah populasi manusia) hidup di daerah dengan transmisi malaria dan tiga puluh lima negara (30 di sub-Saharan afrika dan 5 di Asia) memiliki tingkat kematian yang disebabkan oleh malaria sebanyak 98%. Pada tahun 2008 malaria diperkirakan mencapai 190-311 juta gejala klinis dengan tingkat kematian sebanyak 708.000-1.003.000 orang (CDC, 2010).

Akibat tingkat kesakitan dan kematian yang sangat tinggi, maka telah mendorong berbagai upaya pencegahan maupun pengobatan dalam memberantas penyakit diantaranya dengan cara kontrol vektor, penggunaan obat antimalaria, penggunaan kelambu dan sarana anti nyamuk lainnya. Upaya-upaya ini telah memberikan hasil yang positif dalam membatasi meluasnya penyakit ini, tetapi eradikasi malaria masih jauh dari harapan. Salah satu kendala dalam memberantas

malaria adalah adanya resistensi obat malaria terhadap *Plasmodium* terutama resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin yang merupakan obat lini pertama (Harijanto, 2000).

Adanya resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria, telah mendorong upaya pencarian dan pengembangan obat antimalaria baru terutama dari bahan alam.

Ekstrak metanol daun kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms) telah terbukti secara ilmiah berpotensi sebagai antimalaria. Aktivitas ekstrak metanol daun kapur secara *in vivo* dikategorikan memiliki aktivitas baik dengan nilai ED₅₀ 16,16 kg/mgBB. Selain itu, fraksi larut kloroform ekstrak metanol (FG₈) memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem yang lebih besar dengan IC₅₀ 18,22 µg/ml dibandingkan dengan klorokuin yang memiliki IC₅₀ 240,98 µg/ml (Turalely, 2011). Pemisahan terhadap ekstrak metanol daun kapur telah dilakukan menggunakan *vacuum liquid chromatography* dengan perbandingan eluen secara bergradien mulai dari n-heksan, kloroform, etil asetat dan metanol (non polar sampai polar). Hasil pemisahan setelah dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis diperoleh 12 Fraksi. Fraksi 12 terlarut dalam metanol (Turalely, dkk; 2013). Fraksi 12 ekstrak metanol daun kapur belum pernah dilaporkan aktivitasnya sebagai antiplasmodium. Sehingga penelitian ini akan menjelaskan tentang aktivitas antiplasmodium Fraksi 12 ekstrak metanol daun kapur.

METODE PENELITIAN

A. Alat

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah: neraca analitis (OHAUS AR2140), sentrifuse (Eppendorf, Centrifuge 5415 D), *Laminary Air Flow* (ESCO *biosafety cabinet class II AC2-4E1*), Inkubator CO₂ (Innova CO-48), Oven (Mettler), autoclave, mikroskop (Olympus), mikropipet.

B. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi 12 ekstrak metanol daun kapur, giemsa (sigma), media komplit RPMI, serum dan *Red Blood Cells* yang berasal dari golongan darah O⁺, stock *Plasmodium falciparum* strain (FCR3), akuabides, *yellow tip*, *blue tip*, mikroplate 96 well (Nunc).

C. Prosedur Kerja

a. Penyediaan sel darah merah tidak terinfeksi

Sel darah merah yang tidak terinfeksi diperlukan untuk pertumbuhan kultur *P. falciparum* secara *in vitro*. Sel darah merah yang digunakan adalah berasal dari golongan O⁺.

b. Penyediaan serum manusia

Selain RBC, serum juga dibutuhkan untuk pertumbuhan *P. falciparum* dalam media kultur. Serum yang digunakan adalah serum manusia golongan O⁺. Cara memperoleh serum adalah sebagai berikut: Serum yang diperoleh dari donor golongan O⁺ dipisahkan dari RBC dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum selanjutnya diambil atau dipisahkan secara aseptis di ruang *laminar air flow*. Serum yang diperoleh didekomplementasi dengan memanaskan pada suhu 56°C selama 1 jam dalam *water-bath*. Selanjutnya serum yang diperoleh disimpan atau dibekukan pada suhu -20°C.

c. Pembuatan media kultur

Media RPMI dibuat dengan cara sebagai berikut : Serbuk RPMI sebanyak 10,4 gram yang mengandung l-glutamin dilarutkan dalam 960 ml akuabides steril. Ditambahkan HEPES (N-2-

hidroksi etil piperazin-N-2-etan sulfonic acid) sebanyak 5,94 gram. Ditambahkan 50 mg gentamisin sebagai antibiotik dan larutan NaHCO_3 untuk mendapatkan media tanpa serum pH 7,4 yang merupakan pH optimum pertumbuhan parasit. Media disterilisasi dengan filtrasi melalui filter mikro ukuran 0,22 μm . Media umumnya dibagi dalam volume 100-200 ml dan disimpan dalam suhu 4°C untuk menghindari kerusakan dan kontaminasi.

d. Pembuatan sel darah merah terinfeksi

Disiapkan tiga larutan yaitu larutan A yang mengandung 12% NaCl dalam akuabides steril, larutan B mengandung 1,6% NaCl dalam akuabides steril, dan larutan C mengandung 0,2% dekstrosa dan 0,9% NaCl dalam akuabides steril. Diambil ampul yang mengandung *P. falciparum* strain resisten klorokuin (FCR3) dalam tabung nitrogen dan dengan segera dicairkan dalam *water-bath* suhu 37°C. Dipindahkan cairan dalam ampul dengan pipet mikro ukuran 1 ml ke dalam *conical tube* steril 15 ml dan diukur volume cairan. Ditambahkan tetes demi tetes larutan A dalam *conical tube* dengan perbandingan 0,2 ml larutan A untuk setiap 1 ml larutan dalam ampul. Selanjutnya didiamkan dalam *laminar air flow* selama 3 menit. Ditambahkan tetes demi tetes larutan B ke dalam *conical tube* dengan perbandingan 10 ml larutan B untuk setiap 1 ml larutan dalam ampul. Larutan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan dibuang dari *conical tube* dan ditambahkan larutan C ke dalam *conical tube* dengan perbandingan 10 ml untuk setiap 1 ml larutan dalam ampul. Larutan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dipindahkan dan ditambahkan media komplit dan serum manusia ke dalam endapan dan kultur siap diinkubasi.

e. Pembuatan kultur *P. falciparum*

Kultur *P. falciparum* strain resisten klorokuin (FCR3) dikerjakan dengan metode *candle jar* (Trager & Jensen, 1976). Sel darah merah yang terinfeksi parasit dibiakkan dalam *culture flask* yang mengandung 8 ml media komplit (mengandung 10% serum), dengan hematokrit akhir 1,5%. Manipulasi kultur tersebut dilaksanakan di dalam *laminary flow cabinet* dalam kondisi aseptis, kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO_2 pada temperatur 37°C. Media diganti dengan yang baru setiap 24 jam masa inkubasi. Apabila parasitemia terlalu tinggi (lebih dari 10%), maka dibuat subkultur dengan menambahkan sel darah merah normal sehingga parasitemia menjadi rendah (kurang dari 1%) dan siap untuk uji aktivitas antiplasmodial.

f. Preparasi senyawa uji

Bahan uji (fraksi ekstrak metanol) ditimbang sebanyak 5 mg dilarutkan dengan 200 μl (kurang dari 5%) DMSO, kemudian ditambahkan RPMI sampai volume 5ml sebagai larutan stok. Larutan stok kemudian diencerkan dengan RPMI, dan dibuat 6 peringkat dosis yaitu 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ dan 400 $\mu\text{g/mL}$.

g. Sinkronisasi

Parasit yang dipakai untuk uji antiplasmodial dimulai dari stadium ring. Cara memperolehnya adalah dengan sinkronisasi dengan larutan sorbitol 5%. Parasit malaria disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Cairan supernatan dibuang, kemudian endapan parasit direndam di dalam larutan sorbitol steril sebanyak 3 kali volume parasit dan didiamkan pada temperatur kamar selama 10 menit. Selama periode ini maka stadium skizon akan lisis dan meninggalkan stadium trofozoit. Parasit kemudian dicuci dengan menambahkan media komplit sebanyak 5 kali volume. Kemudian endapan parasit yang hanya terdiri dari stadium ring akan diperoleh dengan memutar seperti cara sebelumnya. Parasit kemudian dikembalikan ke dalam kultur dan akan tumbuh menjadi skizon dalam waktu 24 jam kemudian.

h. Persiapan mikrokultur

Microplate yang digunakan mempunyai 96 sumuran untuk kelompok kontrol dan perlakuan. Volume akhir suspensi untuk kontrol dan perlakuan di masing-masing sumuran dipersiapkan sebanyak 100 μl media komplit yang mengandung parasit dengan hematokrit 3% dan parasitemia 2%. Kemudian ditambahkan senyawa uji atau media komplit sesuai perlakuan pada berbagai stadium perkembangan parasit sebanyak 100 μl , sehingga didapat kultur dengan hematokrit akhir 1,5% dan parasitemia 1%. Fraksi 12 (FG12) yang diberikan dalam konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi FG12 didalam mikroplate 96 well yang diujikan adalah 0,5; 2,5; 12,5; 25; 100; dan 200 $\mu\text{g/mL}$ dan dibuat triplikat untuk setiap tes di tiap baris. *Microplate* kemudian diletakkan di dalam kotak desikator hampa udara dengan memakai lilin (*candle jar*). Supaya terdapat konsentrasi gas yang optimal untuk kultur, maka desikator ditutup rapat pada waktu nyala lilin di dalamnya akan mati kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C .

i. Pemeriksaan aktivitas antiplasmodial

Uji aktivitas antiplasmodial pada berbagai stadium perkembangan *P. falciparum* dilakukan pada masa inkubasi parasit selama 72 jam. Kultur diberi perlakuan dengan 6 peringkat dosis yaitu dosis rendah, dosis sedang, dan dosis tinggi. Setelah masa inkubasi berakhir, setiap sampel dibuat apusan dan diwarnai dengan pewarna giemsa untuk selanjutnya dihitung parasitemianya secara visual dengan mikroskop. Teknik pembuatan apusan darah yaitu diambil kurang lebih 200 μl kultur parasit dengan pipet mikro dan dimasukkan dalam tabung *Eppendorf* untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama kurang lebih 30 menit. Supernatan dalam *Eppendorf* dibuang dan diambil endapan RBC dengan pipet mikro, diteteskan pada salah satu obyek glass. Obyek glass yang lain diambil dan diletakkan tepat menyentuh tetesan RBC pada obyek glass satunya dengan kemiringan 45° . Obyek glass digeser ke ujung yang lain sehingga diperoleh apusan seperti yang dikehendaki. Apusan yang terbentuk dikeringkan 5-10 menit, setelah kering ditambahkan metanol dan dikeringkan. Setelah kering ditambah pewarna giemsa 5% pada apusan dan dibiarkan 30 menit. Selanjutnya giemsa dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Apusan yang terbentuk bisa dilihat pada mikroskop cahaya dengan menambah minyak imersi. Kemudian dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* setiap 1000 eritrosit dan dihitung persentase parasitemianya.

HASIL PENELITIAN

Hasil uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* fraksi 12 (FG12) ekstrak metanol diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pesentase Penghambatan dan IC_{50} Fraksi 12 (FG12) Ekstrak Metanol Daun Kapur

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persentase Penghambatan Parasitemia (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
200	81,61	3,88
100	66,47	
25	56,27	
12,5	51,4	
2,5	47,95	
0,5	43,86	

Berdasarkan data yang ditampilkan pada Tabel 1, menunjukkan bahwa pada aktivitas antiplasmodium fraksi 12 (FG12) ekstrak metanol daun kapur memiliki aktivitas paling baik yaitu dengan nilai IC_{50} sebesar 3,88 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini sejalan standar yang ditetapkan oleh Gessler *et al* (1994) yang menyatakan bahwa suatu ekstrak bahan alam yang berpotensi sebagai antimalaria memiliki aktivitas paling baik berada pada rentang IC_{50} 0-5 $\mu\text{g/mL}$. Data IC_{50} ini diperoleh setelah data persentase penghambatan parasitemia dan konsentrasi FG12 dianalisis menggunakan analisis probit menggunakan SPSS. Jika dibandingkan dengan ekstrak metanol daun kapur yang memiliki aktivitas antiplasmodium in vitro dengan IC_{50} sebesar 14,22 $\mu\text{g/mL}$ (Turalely, dkk; 2013) , maka fraksi 12 (FG12) ekstrak metanol daun kapur memiliki aktivitas yang paling baik dibandingkan dengan ekstrak metanol daun kapur. Semakin kecil nilai IC_{50} aktivitas antiplasmodium dari suatu bahan alam, maka semakin besar aktivitas bahan tersebut berpotensi untuk dijadikan sebagai antimalaria. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka Fraksi 12 (FG12) ekstrak metanol daun kapur berpotensi dikembangkan untuk mencari dan menemukan senyawa aktif yang berperan sebagai antimalaria dari daun kapur.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, nilai IC_{50} FG12 ekstrak metanol adalah 3,88 $\mu\text{g/mL}$. Nilai ini menunjukkan bahwa FG12 ekstrak metanol memiliki aktivitas paling baik sebagai antiplasmodium.

DAFTAR PUSTAKA

- Center for Disease Control and Prevention, Malaria. 2010. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/html>. [diakses 31 Mei 2010].
- Chowdurry, K., Bagasra. O., 2007. An edible vaccine for malaria using transgenic tomatoes of varying sizes, shapes and colors to carry different antigen. *Medical Hypotheses*. 68 (1): 22-30.
- Dua, V.K., Ojha, V.P., Roy, R., Joshi, B.C., Valecha, N., Usha-Devi, C., Bhatnagar, M.C., Sharma, V.P., Subbarao, S.K., 2004. Anti-malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. *J. Ethnopharm.* 95: 247-251.
- Gessler MC, Nkunya MHN, Mwasumbi LB, Heinrich M, Tonner M. *Screening Tanzanian medical plants for antimalarial activity. Acta Trop* 1994; 55: 65-7.
- Hariyanto, P.N., 2000. *MALARIA. Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinik, & Penangana*. 36, 152, 153. EGC, Jakarta.
- Mustofa, Sholikah, E.N., Wahyuono, S., 2007. *In vitro* and *In vivo* Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of Extracts of *Phyllanthus niruri* L. Herbs Traditionally Used to Treat Malaria In Indonesia. *J. Trop Med Public Health*. 38(4) : 609 – 615.
- Turalely R., Susidarti, R.A., Wijayanti, M. A. 2011. In Vivo Antiplasmodial of the Most Active Fraction and Its Compound of kapur Leaves (*Harmsioplanax aculeatus* Harms) Extract Against Plasmodium berghei. *Tropical Medicine Journal* .Vol.. 01, No.02: 131-140.
- Turalely, R., Mahulette, F., 2013, Uji Aktivitas Antiplasmodium dan Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Daun Kapur Dan Fraksi dari Ekstrak Daun Kapur Paling Aktif, *Laporan Penelitian Ristek 2013*, Universitas Pattimura.