

**AKTIVITAS ANTIPLASMODIUM *In vitro* DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DARI EKSTRAK
ETANOL BATANG MANURAN (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex
K.Heyne) ASAL KALIMANTAN SELATAN**

Arnida¹, Eka Rahmawaty Sahi¹, Sutomo¹

¹) Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat KalSel
Korespondensi, email: arnida01@unlam.ac.id

ABSTRAK

Resistensi *Plasmodium* terhadap obat malaria mengakibatkan kegagalan pengobatan. Hal ini merupakan ancaman terlebih belum ditemukannya obat alternatif yang efektif untuk melawan resistensi. Oleh karena itu ketersediaan antimalaria baru sangat diperlukan untuk melawan resistensi. Pencarian obat baru terus dilakukan melalui berbagai cara termasuk eksplorasi dan pengembangan bahan alam. Pemilihan bahan alam biasanya berdasarkan penggunaan secara empiris oleh masyarakat. Tanaman Manuran (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K.Heyne) digunakan oleh masyarakat di Kotabaru Kalimantan Selatan untuk mengobati malaria. Penelitian yang dilaksanakan adalah melakukan uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* dengan menentukan nilai konsentrasi penghambatan (IC₅₀) dan melakukan identifikasi golongan senyawa dari ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne. Berdasarkan identifikasi golongan senyawa kimia dengan skrining fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis menunjukkan adanya senyawa flavonoid, terpenoid, saponin, tanin dan antrakuinon pada batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne. Ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne mempunyai aktivitas antiplasmodium *in vitro* tergolong aktif dengan IC₅₀ 45,864 ± 0,76 µg/mL.

Kata Kunci: manuran, *Coptosapelta tomentosa*, antiplasmodium *in vitro*, IC₅₀, flavonoid

ABSTRACT

The resistance of Plasmodium to antimalarial drugs resulted in treatment failure. It posed a threat in the absence of alternative effective drug for the resistance. Therefore, the availability of new antimalarial drug was highly required to overcome this problem. Exploration of new antimalarial drugs was conducted using various methods, including exploration and development of natural substance. The selection of the natural substance was usually conducted on the basis of empirical use by people. Manuran (Coptosapelta tomentosa Valeton ex K.Heyne) was used by people living in Kotabaru of South Kalimantan to treat malaria. An in vitro antiplasmodial activity test was carried out to the resulting ethanol extracts of the plant using candle jar method. The resulting data was processed using probit analysis to give the IC₅₀ value. Based on the identification of chemical content with phytochemical screening and Thin Layer Chromatography shows the presence of flavonoids, terpenoids, saponins, tannins and anthraquinones in C. tomentosa Valeton ex K.Heyne) stem. The in vitro antiplasmodial activity of the ethanol ekstrak of C. tomentosa Valeton ex K.Heyne) were classified to be active, the IC₅₀ values $45,864 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$.

Keyword: manuran, Coptosapelta tomentosa Valeton ex K.Heyne, in vitro antiplasmodial, IC₅₀, flavonoide

PENDAHULUAN

Penyebab gagalnya pemberantasan malaria adalah munculnya resistensi *Plasmodium* terhadap antimalaria dan resistensi vektor terhadap insektisida. Nyamuk *Anopheles* (vektor) telah resisten terhadap insektisida seperti DDT sehingga mengakibatkan peningkatan jumlah kasus penyakit malaria di beberapa negara tropis (Sherman & Irwin, 2011; WHO, 2012). Penggunaan artemisinin sebagai obat malaria akhirnya terkendala juga dengan timbulnya resistensi yang dilaporkan terjadi di perbatasan Kamboja-Thailand (WHO, 2011;

Satimai *et al.*, 2012). Penggunaan obat dengan intensitas tinggi merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya resistensi. Resistensi pada kloroquin dan sulfadoksin-pirimetamin yang sangat cepat penyebarannya memberikan gambaran kemungkinan meluasnya resistensi. Oleh karena itu ketersediaan antimalaria baru dibutuhkan untuk melawan resistensi.

Berbagai strategi dilakukan para peneliti dalam menemukan dan mengembangkan antimalaria baru, diantaranya melalui eksplorasi dan pengembangan bahan alam serta melalui sintesis senyawa baru untuk

meningkatkan aktivitas dan menekan efek samping (Ridley, 2002; Rosenthal, 2003). Uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* dimaksudkan sebagai penyelidikan awal terhadap aktivitas antimalaria dari suatu bahan. Banyak senyawa alam berhasil diisolasi dan dibuktikan aktivitas antiplasmodium baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Aktivitas tersebut ditimbulkan oleh adanya metabolit sekunder yang bertanggung jawab pada aktivitas tersebut berupa golongan alkaloid, terpen, flavonoid, glikosida, saponin, tanin, dan beberapa antimalaria bahan alam lainnya (Mustofa, 2009). Beberapa tanaman yang secara empirik digunakan oleh masyarakat untuk mengobati malaria telah diteliti dan dilaporkan mempunyai aktivitas antiplasmodium antara lain sambiloto (*Tinospora crispa*) (Muktiningsih, 2005), pepaya (*Carica papaya*) (Hadi, 2003), dan Umbi Hati tanah (*Angiopteris evecta*) (Arnida *et al*, 2015). *Coptosapelta tomentosa* Valeton ex K.Heyne (Manuran) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang banyak ditemukan di Kotabaru Kalimantan Selatan, secara empirik

digunakan sebagai antimalaria. Penelitian ini dimaksudkan untuk memberi data ilmiah tentang aktivitas antiplasmodium *in vitro* dari ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valeton ex K.Heyne.

METODE PENELITIAN

1. Bahan untuk Ekstraksi

Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96%, untuk uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* digunakan RPMI, HEPES, NaHCO₃, gentamisin, RBC (*Red Blood Cell*) golongan darah O, *P. falciparum* strain FCR3, natrium klorida 0,9%; 1,6%; 12%, serum darah manusia golongan darah O, lilin, gliserol 10%, sorbitol 5%, metanol, DMSO, klorokuin, air suling, alkohol, dekstrosa 0,2%, gliserol, medium freezing (28 mL gliserol; 72 mL sorbitol 4,2% dalam NaCl 0,9%), giemsa, dan minyak imersi.

3. Subyek Penelitian

Penelitian menggunakan batang *C. tomentosa* Valeton ex K.Heyne yang diambil dari Kotabaru Kalimantan Selatan. Parasit yang digunakan adalah *P. falciparum* strain FCR3 diperoleh dari

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4. Peralatan

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah alat-alat gelas, oven, grinder, ayakan, timbangan, seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator* (Buchi Rotavapor), cawan, waterbath, pompa vakum. Alat-alat yang digunakan untuk uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* adalah *mikroplate 96 well*, flask kultur, pipet mikro, tip biru, tip kuning, mikroskop, objek glass, *mikro tube*, *culture tube*, *chryo tube*, *membran filter* 0,20 μm , *laminar air flow* (LAF), almari pendingin, *autoclave*, oven, *candle jar*, inkubator, penangas air, pipet pasteur.

5. Jalannya Penelitian

a. Determinasi dan *ethical clearance*

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense, Balitbang Botani-Puslitbang Biologi LIPI Bogor. *Ethical clearance* dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. Pengolahan tanaman *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne

Tanaman *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne diambil dari desa Sungai Buah kecamatan Pulau Laut Timur Kabupaten Kotabaru Provinsi Kalimantan Selatan. Sebanyak 400 gram serbuk kasar batang *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne direndam menggunakan pelarut etanol dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:3 yaitu sebanyak 1,2 L pelarut. Ekstrak cair diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak diuji aktivitas antiplasmodium *in vitro* dan dilakukan identifikasi golongan senyawa dari bahan.

c. Uji aktivitas antiplasmodium *in vitro*

Uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* dilakukan terhadap ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne, uji ini menggunakan metode *candle jar* (Trager & Jansen, 1976; Moll *et al.*, 2008).

1) Preparasi bahan

Bahan ditimbang lalu ditambahkan 100 μL DMSO dan 900 μL larutan RPMI disterilkan dengan filtrasi menggunakan *membrane filter* 0,20 μm . Bahan (ekstrak) dibuat peringkat konsentrasi 500, 250, 50, 25, 5, 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Klorokuin

digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan peringkat konsentrasi 20, 16, 12, 8, dan 4 µg/mL.

2) Pengujian

Bahan uji dan *Plasmodium* telah siap selanjutnya menyediakan *mikroplate* (96 sumuran) dan *mapping* untuk pengujian. Ke dalam *mikroplate* (sesuai *mapping*) dimasukkan: 100 µL media RPMI sebagai kontrol negatif, 100 µL larutan uji dan klorokuin sebagai kontrol positif. Campuran *Plasmodium* 100 µL (hasil sinkronisasi) ditambahkan ke dalam *mikroplate* yang telah berisi kontrol negatif, larutan uji, dan kontrol positif. *Mikroplate* dimasukkan dalam *candle jar*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Pada masa inkubasi selesai *mikroplate* dikeluarkan dari *candle jar* kemudian dilakukan panen dengan cara campuran dari setiap lubang dipindahkan ke dalam *mikro tube*, disentrifus, supernatan dibuang.

Endapan dibuat apusan pada objek gelas, setelah kering apusan diviksasi dengan metanol. Apusan dalam keadaan kering dicat dengan pewarna Giemsa 5%, didiamkan sampai 30 menit, dicuci dengan air

kran mengalir. Biarkan kering, setelah itu ditambahkan minyak imersi. Pada mikroskop dapat dilihat dan dihitung jumlah eritrosit dan parasitemia dari apusan. Persen parasitemia dihitung dengan cara membandingkan jumlah eritrosit terinfeksi dari sekitar 1000 eritrosit.

6. Identifikasi Golongan Senyawa dari Ekstrak Etanol Batang *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne

Identifikasi golongan senyawa yang dilakukan dengan metode reaksi kimia, meliputi golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, terpenoid, dan antrakuinon (Harborne, 2006).

7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* ditampilkan dalam bentuk kurva hubungan antara konsentrasi senyawa uji dengan persen penghambatan pertumbuhan parasit. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisa probit dari persen penghambatan dengan logaritma konsentrasi uji. Aktivitas antiplasmodium *in vitro* dikategorikan berdasarkan nilai IC₅₀ yang diperoleh. Aktivitas antiplasmodium *in vitro* dinyatakan

sangat aktif jika memiliki nilai $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ (Gessler *et al.*, 1994; Munoz *et al.* 1999; Karov *et al.*, 2003; Bickii *et al.*, 2007), tergolong aktif jika nilai IC_{50} berkisar 5-50 $\mu\text{g/mL}$ (Karov *et al.*, 2003, Bickii *et al.*, 2007), kurang aktif bila IC_{50} 50 – 100 $\mu\text{g/mL}$ dan tidak aktif jika $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Bickii *et al.*, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak yang sudah diuapkan di *waterbath* sampai bobot tetap diperoleh ekstrak kental sebanyak 42,78 gram. Rendemen yang didapat adalah 10,695%. Hasil pengujian aktivitas antiplasmodium *in vitro* ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne secara *triplet* diperoleh rerata persentase parasitemia, penghambatan, dan nilai IC_{50} (Tabel 1). Persen parasitemia diperoleh dari persentase jumlah eritrosit terinfeksi per seribu eritrosit. Persentase parasitemia diperoleh semakin kecil dengan meningkatnya konsentrasi dari ketiga fraksi uji. Aktivitas antiplasmodium

C. tomentosa Valetton ex K.Heyne dinyatakan dalam konsentrasi penghambatan 50% (IC_{50}) yang dihitung dengan menggunakan analisis probit pada program SPSS 16. Hasil uji aktivitas antiplasmodium *in vitro* *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne rerata nilai IC_{50} $45,864 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$. Aktivitas antiplasmodium *in vitro* ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne dinyatakan aktif atau potensial. Aktivitas ini dikategorikan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, tergolong aktif jika nilai IC_{50} berkisar 5-50 $\mu\text{g/mL}$ (Karov *et al.*, 2003, Bickii *et al.*, 2007). Kategori sangat aktif dengan $IC_{50} \leq 5 \mu\text{g/mL}$ diperoleh dari skrining terhadap 43 tanaman di Afrika Selatan diperoleh 10 tanaman yang memiliki aktivitas antiplasmodium *in vitro* kuat. Dua di antara tanaman tersebut yaitu *Tabernaemontana elegans* Stapf (Apocynaceae) dan *Vangueria infausta* Burch memiliki $IC_{50} < 2 \mu\text{g/mL}$ (Bapela *et al.*, 2014).

Tabel 1. Rerata Persentase Parasitemia dan Penghambatan serta nilai IC_{50} ekstrak etanol dari batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Parasitemia $\pm\text{SD}$	Rerata Persen Penghambatan $\pm\text{SD}$	Rerata $IC_{50} \pm\text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$)
500	$96,670 \pm 0,67$	$0,500 \pm 0,10$	$45,864 \pm 0,76$

250	68,625 ± 4,30	4,710 ± 0,65
50	58,050 ± 0,71	6,298 ± 0,11
25	22,360 ± 1,06	11,656 ± 0,16
5	15,688 ± 0,35	12,657 ± 0,05
0,5	3,972 ± 0,84	14,416 ± 0,13

2. Identifikasi golongan senyawa

Identifikasi golongan senyawa yang diperoleh adalah menunjukkan

hasil yang positif untuk senyawa golongan flavonoid, tanin, saponin, antrakuinon dan terpenoid (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil identifikasi golongan senyawa ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne

Golongan Senyawa	Jenis pereaksi	Hasil
Alkaloid	Dragendroff	-
	Mayer	-
Flavonoid	Uap amoniak	+
Tanin	FeCl ₃	+
Saponin	Tes buih	+
Steroid	Lieberman Burchard	-
Terpenoid	Salkowski's Test	+
Antrakuinon	Amoninak	+

Masing-masing senyawa memiliki aktivitas antiplasmodium. Senyawa golongan terpenoid, fenol dan sterol berinteraksi dengan sistem elektronik hem dan terjadinya ikatan antara senyawa-senyawa yang memiliki gugus hidroksil dalam ekstrak dengan ion besi hem (Basilico *et al.*, 1998 dalam Purwanto, 2011). Gugus hidroksil juga terdapat pada senyawa golongan tanin, saponin dan terpenoid. Golongan flavonoid memiliki mekanisme aksi dengan menghambat transport nutrisi yang dibutuhkan *Plasmodium* serta menghambat degradasi hemoglobin dan detoksifikasi hem (Bilia *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Aktivitas antiplasmodium *in vitro* *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne memiliki rerata nilai IC₅₀ 45,864 ± 0,76 µg/mL. Aktivitas ini dikategorikan serta dinyatakan aktif atau potensial. Ekstrak etanol batang *C. tomentosa* Valetton ex K.Heyne mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, antrakuinon dan terpenoid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas segala bantuan dan dukungan kepada semua pihak. Kepada DRPM Kemenristekdikti atas bantuan pembiayaan melalui hibah penelitian Penelitian Produk Terapan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnida, Wahyono, Mustofa, & Susidarti, R.A., 2015, *In vitro* antiplasmodial activity of ethanol extracts of Borneo medicinal plants (*Hydrolea spinosa*; *Ampelocissus rubiginosa*; *Uraria crinite*; *Angiopteris evecta*), *Int J of Pharm and Pharma Sci.* 7(5): 72-75.
- Bapela, J.M., Meyer, M., & Kaiser, M., 2014, *In vitro* antiplasmodial screening of ethnopharmacologically selected South African plant species used for the treatment of malaria, *J Ethnopharmacol*, 3: 245-248
- Basilico, N., E. Pagani, D. Monti, P. Olliaro, & D. Taramelli. 1998. A Microtitre-Based Method for Measuring the Haem Polymerization Inhibitory Activity (HPIA) of Antimalarial Drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 42: 55–60.
- Bickii, J., Tchouya, G.R.F., Tchouankeu, J.C., & Tsamo, E., 2007, Antimalarial activity in crude extracts of some cameroonian medicinal plants, *Afr J Trad CAM.*, 4 (1): 107-111
- Bilia, A.R., P. Melilo de Malgalhaes, MC. Berganzi & FF. Vincieri. 2006. Simultaneous Analysis of Artemisinin and Obtained from a Commercial Sample and Selected Cultivar. *J Phytomed.* 13: 487-493. Gessler, M.C., Nkunya, M.H.H., Mwasumbi, L.B., Heinrich, M., & Tanner, M., 1997, Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity, *Acta Tropica*, 56(1): 65-77.
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi ke-2. Penerbit ITB, Bandung.
- Karov, D., Dicko, M.H., Sanon, S., Simpore, J., & Traore, A.S., 2003, Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm.f (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir (Fabaceae), *J Ethnopharmacol*, 89: 291-294.
- Moll, K., Ljungstrom, I., Perlmann, H., Scherf, A., & Wahlgren, M., 2008, *Methods in Malaria Research*, University Boulevard, Manassas, 1-55.
- Muktiningsih, S.R., Muhammad, H.S., Warsana, I.W., Budhi, M., & Panjaitan, P., 2005, Review tanaman obat yang digunakan oleh pengobat tradisional di sumatra utara, sumatra selatan, bali dan sulawesi selatan, *Media Litbang Kesehatan* XI, 4: 25-36.
- Munoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G, Callapa, J., Bergeron, S., Rojas, I., *et al.*, 1999, A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach part I. evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chocobo Indians, *J Ethnopharmacol.*, 000: 1-11.
- Mustofa. 2009. *Obat Antimalaria Baru: Antara Harapan dan Kenyataan*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Purwanto. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penghambat Polimerisasi Hemdari Fungi Endofit Tanaman *Artemisia annua* L. Tesis. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ridley, R.G., 2002, Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs, *Nature*, 415: 686-693.
- Rosenthal, J.P., 2003, Antimalarial drug discovery: old and new approaches, *J experiment Biol*, 206: 3735-3744
- Satimai, W., Sudathip, P., Vijakadge, S., Khamsiriwatchara, A., & Sawang, S., 2012, Artemisinin resistance containment project in Thailand, responses to mefloquine-artesunate combination therapy among *falciparum* malaria patients in provinces bordering Cambodia, *J Malaria*, 11(1): 300-303.
- Sherman & Irwin, W., 2011, *Magic Bullet to conquer malaria: from quinine to Qinghaosu*, ASM Press, US., p. 225
- Trager, W., & Jensen, J.B., 1976, Human malaria parasites in continuous culture, *Science*, 193: 673-676.
- WHO, 2011, *Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC)*, WHO Press, Geneva, 19.
- WHO. 2012. Disease Burden in SEA Region. http://www.searo.who.int/LinkFiles/Malaria_in_the_SEAR_Map_SEAR_Endemicity_10.pdf. Diakses tanggal 21 Maret 2012.