

# PROC 01

*By* JHONS SUWANDI

1

## AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEM ANTIPLASMODIUM EKSTRAK DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens*) *IN VITRO*

8

### 1. PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium sp.* Parasit ini bersifat intraseluler, yang ditularkan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Ada empat

*Plasmodium sp* yang dapat menginfeksi manusia yaitu : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale* (Faust *et al*, 1977; Markell *et al*, 1986; Garcia & Bruckner, 1997; Natadisastra & Rusmartini, 1999; Heelan & Ingersoll, 1999; Anonymous, 2006a; Depkes RI, 2006). Spesies yang banyak ditemui di Indonesia adalah *P. falciparum* & *P. vivax* (Depkes RI, 2006).

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok resiko tinggi yaitu bayi, balita, dan ibu hamil. Di Indonesia menurut SKRT Tahun 2001, terdapat 15 juta kasus malaria dengan 38.000 kematian setiap tahunnya. Diperkirakan 35% penduduk Indonesia tinggal di daerah yang beresiko tertular

12

malaria. Dari 293 kabupaten/kota yang ada di Indonesia, 167 kabupaten/kota merupakan daerah endemis malaria (Depkes RI, 2006).

5

Penyakit ini memberikan gejala demam yang berfluktuasi dengan gambaran yang khas yaitu demam tinggi yang diikuti dengan menggigil dan diakhiri dengan turunnya suhu tubuh yang disertai dengan timbulnya keringat yang banyak. Gejala ini dapat timbul setiap 36, 48 atau 72 jam, tergantung spesies yang menginfeksi (Natadisastra & Rusmartini, 1999).

7

Pengobatan malaria di Indonesia saat ini di beberapa daerah masih menggunakan obat standar kloroquin dengan dosis 600 mg hari pertama dan kedua serta 300 mg hari ketiga. Efektivitas pemberian kloroquin saat ini sudah mulai diragukan karena telah banyak ditemukan resistensi terhadap obat ini. Resistensi pertama sekali kloroquin terhadap *P. falciparum* di Indonesia ditemukan di Kalimantan Timur pada tahun 1973 (Depkes RI, 2006). Resistensi ini terus menyebar ke seluruh Indonesia termasuk di Propinsi Lampung dan pada Tahun 1990 dilaporkan telah terjadi resistensi terhadap *P. falciparum* diseluruh propinsi di Indonesia (Depkes RI, 2006).

Selain penggunaan kloroquin untuk pengobatan malaria, telah juga digunakan obat-obatan lain seperti primakuin, sulfadoksin-pirimetamin. Namun obat-obatan ini pun telah ditemukan adanya resistensi (Depkes RI, 2006). Resistensi timbul akibat penggunaan obat malaria tidak adekuat dan tidak sesuai dengan aturan cara pemakaiannya.

1

Timbulnya resistensi *Plasmodium sp* terhadap antimalaria mendorong para peneliti mencari antimalaria baru untuk menggantikan antimalaria yang tidak efektif lagi. Salah satu usaha menemukan antimalaria baru adalah melalui penelitian terhadap tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengobati malaria. Keberhasilan pengembangan tanaman obat untuk antimalaria terbukti dengan ditemukannya obat baru yaitu artemisinin dan derivatnya. (Depkes RI, 2006).

6

Sebagian masyarakat di Sumatra Selatan dan Lampung menggunakan daun sungkai (*P. canescens* Jack) sebagai antiplasmodium atau obat demam (Heyne, 1987). Tumbuhan ini merupakan tumbuhan khas Indonesia yang terdapat di Sumatra bagian selatan dan Kalimantan (Heyne, 1987; Subeki, 2004). Pada penelitian terdahulu ekstrak etanol tumbuhan ini memiliki penghambatan pertumbuhan *P. berghei* pada mencit jantan galur Swiss dengan ED<sub>50</sub> 102 mg/kgBB (Suwandi, 2006). Ekstrak daun sungkai juga terbukti mempunyai sifat antiparasitik lain yaitu pada kultur *in vitro* *Babesia gibsoni* (Subeki, 2004; Murningsih, 2005).

Meskipun daun sungkai telah dipakai oleh sebagian masyarakat untuk mengobati malaria dan telah dibuktikan efeknya dengan menggunakan ekstrak etanol pada penelitian dengan *P. berghei* akan tetapi bagaimana mekanisme aksinya terhadap parasit tersebut, belum

17 pernah diteliti lebih jauh. Melihat hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji mekanisme aksi melalui uji penghambatan polimerisasi hem.

5 Berdasarkan latar belakang yang dijelaskan, maka secara terperinci permasalahan penelitian adalah apakah ekstrak aseton, etanol dan air dari daun *P. canescens* memiliki kemampuan menghambat polimerisasi hem *in vitro* ?

16

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Bahan dan Materi Penelitian

Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak bahan uji adalah simplisia daun *P. canescens*. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah aseton absolut, etanol 96% dan air. Daun *P. canescens* diambil dari tepi jalan di sekitar kebun warga di Kecamatan Tebing Tinggi dan di Desa Gunung Kerte Kecamatan Kikim Timur Kabupaten Lahat Propinsi Sumatra Selatan. 1 Daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu tua atau daun dari pelepah kelima sampai pucuk daun. 13 Daun tersebut dideterminasi di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Bahan untuk uji penghambatan polimerisasi hem adalah larutan hematin 4 mM dalam NaOH 0,1 M, aquades, larutan asam asetat glasial (pH 2,6), dimetilsulfoksida, kloroquin, dan larutan NaOH 0,1 M.

### 2.2 Alat Yang Dipakai

Timbangan analitik (sartorius), *blender*, saringan kain, *rotary evaporator*, *water bath*, dan cawan porselin digunakan untuk membuat ekstrak bahan uji. Alat yang digunakan untuk uji penghambatan polimerisasi hem adalah mikrokultur 96 sumuran steril untuk kultur, inkubator CO<sub>2</sub>, sentrifuse, *ELISA reader*, tabung *effendorf* dan mikropipet.

### 2.3 Jalan Penelitian

14 Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK UGM. Penelitian ini bersifat eksperimental *in vitro*. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu :

#### Tahap I : Pembuatan Ekstrak Bahan Uji

Ekstrak bahan uji yang digunakan adalah ekstrak yang sudah dibuat pada penelitian sebelumnya. Pembuatan ekstrak bahan uji telah dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM dengan menggunakan ekstraksi secara maserasi. Daun yang diambil dibuat simplisia dengan mengeringkan pada suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari langsung. Bahan kering tersebut dibuat serbuk sampai halus dan disaring dengan saringan tertentu sampai didapat serbuk yang homogen. 5 Simplisia yang sudah homogen ini kemudian dilakukan ekstraksi secara maserasi bertingkat. 11 Maserasi dilakukan dengan cara merendam dan mengaduk serbuk simplisia dalam cairan penyari dengan perbandingan 1 bagian simplisia dengan 9 bagian cairan penyari selama 24 jam sehingga zat aktif yang berada di dalam rongga sel akan larut dan karena



perbedaan konsentrasi, zat aktif akan terdesak keluar dari sel. Setelah itu larutan difiltrasi secara perlahan dan pelarut dipertahankan tetap berada diatas serbuk sehingga serbuk tetap terendam. Bila cairan penyari yang keluar sudah berubah warna maka filtrasi dihentikan dan serbuk dikeringkan kembali untuk dilakukan maserasi dengan pelarut lainnya. Selanjutnya, cairan filtrat dipekatkan dengan evaporator hingga pelarutnya habis. Ekstrak kemudian disimpan di dalam botol gelap (Depkes RI, 1986). Maserasi ini dimulai dengan menggunakan pelarut/penyari aseton. Residu yang didapatkan dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96%. Residu yang didapat dari ekstrak etanol kemudian dimaserasi kembali dengan air, sehingga akan didapatkan tiga jenis ekstrak.

#### Tahap II: Uji penghambatan polimerisasi hem.

Uji penghambatan polimerisasi hem dilakukan dengan metode Basilico (1998) yang dimodifikasi. Sebanyak 100  $\mu$ L larutan hematin 1 mM dalam NaOH 0,2 M dimasukkan ke dalam tabung *effendorf*, kemudian ditambahkan 50  $\mu$ L bahan uji dengan berbagai tingkatan dosis. Aquades digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 50  $\mu$ L larutan asam asetat glasial (pH 2,6) ditambahkan pada tabung *effendorf* untuk memulai reaksi polimerisasi hem, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Tabung *effendorf* disentrifuse setelah inkubasi berakhir dan endapan dicuci sebanyak 3 kali dengan 200  $\mu$ L DMSO. Endapan yang diperoleh ditambah 200  $\mu$ L NaOH 0,1 M. Setiap 100  $\mu$ L larutan yang diperoleh di masukkan ke dalam mikropate 96 sumuran dan dibaca nilai OD dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm. Nilai penghambatan polimerisasi hem dinyatakan dalam IC<sub>50</sub> yaitu kadar yang mampu menghambat polimerisasi hem hingga 50% yang dibandingkan dengan kurva standar.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

*P. falciparum* pada siklus hidupnya, akan bermultiplikasi dan menghancurkan hemoglobin sel hospes di vakuola makanan untuk kebutuhan nutrisi. Proses penghancuran hemoglobin ini menghasilkan molekul hem yang toksik yaitu ferriprotoporphyrin IX (FPIX). Parasit malaria intraeritrositik mampu mendegradasi molekul hem menjadi sesuatu yang tidak berbahaya yang disebut hemozoin. Suatu polimer yang identik dengan hemozoin adalah  $\beta$ -hematin.  $\beta$ -hematin dapat dibentuk secara *in vitro* dari hematin dalam suasana asam.  $\beta$ -hematin yang terbentuk diukur absorbansinya menggunakan *Elisa Reader*. Penghambatan polimerisasi hem didapat dengan membandingkan absorbansi pada kelompok perlakuan dengan kadar  $\beta$ -hematin pada kurva.

Hasil uji menunjukkan ekstrak aseton memberikan penghambatan paling tinggi dibandingkan dengan kelompok ekstrak etanol dan air. Ekstrak aseton, etanol dan air pada konsentrasi tertinggi masing-masing mampu menghambat sebesar  $89,09 \pm 14,56\%$ ;  $68,48 \pm$

20,39%; dan  $47,10 \pm 7,72\%$ . Kelompok kloroquin, pada dosis tertinggi mampu menghambat sampai  $100\% \pm 0,00$ . Rerata kadar  $\beta$ -hematin, persentase penghambatan polimerisasi hem dan  $IC_{50}$  untuk setiap bahan uji disajikan pada Tabel 1. Aktivitas penghambatan polimerisasi hem ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$ . Hasil uji ini mendapatkan rerata nilai  $IC_{50}$  untuk ekstrak aseton, etanol, air dan kloroquin masing-masing adalah  $0,40 \pm 0,17$  mg/mL;  $1,46 \pm 0,05$  mg/mL;  $53,89 \pm 29,47$  mg/mL dan  $2,39 \pm 0,38$  mg/mL.

Perbedaan rerata nilai  $IC_{50}$  dari ketiga ekstrak tersebut ditentukan dengan menggunakan uji *Anova*. Hasil uji *Anova* ( $p = 0,05$ ) terdapat perbedaan yang bermakna antara ketiga bahan uji tersebut ( $p = 0,01$ ). Uji statistik ini dilanjutkan dengan *post hoc test*. Hasil *post hoc test*  $IC_{50}$  ekstrak aseton dengan ekstrak etanol ( $p = 0,99$ ) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, sedangkan ekstrak air dengan ekstrak aseton ( $p = 0,02$ ) dan ekstrak air dengan etanol ( $p = 0,02$ ) menunjukkan perbedaan bermakna.

**Tabel 1.** Pengaruh pemberian ekstrak daun *P. canescens* terhadap aktivitas penghambatan polimerisasi hem

Bahan Uji	Konsentrasi (mg/mL)	Rerata Kadar $\beta$ -Hematin (mM) + SD		Rerata Persen Penghambatan + SD		Rerata $IC_{50}$ (mg/mL) + SD
Ekstrak Aseton	5,00	24,05	22,01	84,09	14,56	0,40 $\pm$ 0,17
	2,50	21,33	23,56	85,88	15,59	
	1,25	23,85	31,34	84,22	20,74	
	0,63	53,59	51,26	64,54	33,92	
	0,31	76,77	10,17	49,20	6,73	
	0,16	106,51	12,91	29,52	8,54	
	0,08	124,51	8,71	17,61	5,76	
Ekstrak Etanol	5,00	47,64	30,81	68,48	20,39	1,46 $\pm$ 0,05
	2,50	57,74	25,62	61,79	16,95	
	1,25	77,18	20,52	48,93	13,57	
	0,63	102,82	8,28	31,96	5,48	
	0,31	106,77	7,73	29,35	5,12	
	0,16	127,90	13,21	15,37	8,74	
	0,08	143,59	1,24	4,99	0,82	
Ekstrak Air	20,00	69,75	10,18	47,10	7,72	53,89 $\pm$ 29,47
	16,00	101,75	6,39	22,82	4,85	
	12,00	109,52	6,80	16,92	5,16	
	8,00	106,10	6,10	19,52	4,63	
	4,00	112,15	3,95	14,93	2,99	
	2,00	121,79	3,61	7,62	2,74	
	1,00	126,15	1,09	4,32	0,83	
	0,50	131,66	1,34	0,13	1,02	
Kloroquin	5,00	0,00	0,00	100,00	0,00	2,39 $\pm$ 0,38
	2,50	96,69	17,73	36,02	11,73	
	1,25	136,92	8,70	9,40	5,76	
	0,63	143,38	10,44	5,12	6,91	
	0,31	146,85	4,90	2,83	3,24	
	0,16	146,46	3,26	3,09	2,16	
	0,08	150,31	1,09	0,54	0,72	
Kontrol Negatif untuk Ekstrak Aseton, Etanol dan Kloroquin		151,13	3,56	0,00	0,00	
Kontrol Negatif untuk Ekstrak Air		131,84	2,04	0,00	0,00	

<sup>1</sup> Kemampuan suatu antiplasmodium dalam menghambat polimerisasi hem berhubungan langsung dengan kemampuannya sebagai antimalaria, walaupun diketahui bahwa mekanisme kerja antiplasmodium tidak hanya melalui penghambatan polimerisasi hem. Aktivitas penghambatan polimerisasi hem sebenarnya merupakan kerja satu atau dua mekanisme, yaitu (1) terjadi interaksi antara senyawa terpenoid, fenol dan sterol dengan sistem elektronik hem, (2) ekstrak-ekstrak ini terdiri dari senyawa-senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang dapat berikatan dengan ion besi hem (Basilico, *et al.*, 1998; Syarif, 2007). Menurut Kitagawa *et al.* (1994) senyawa yang memiliki aktivitas antiplasmodium dari daun *P. canescens* adalah peronemins yang termasuk ke dalam golongan clerodane diterpenoid (golongan terpenoid). Peronemins juga merupakan senyawa yang memiliki gugus hidroksil. Melihat hal tersebut, mekanisme kerja ekstrak daun *P. canescens* dalam menghambat polimerisasi hem adalah berinteraksinya senyawa terpenoid dengan sistem elektronik hem dan gugus hidroksil yang berikatan dengan ion besi hem.

Uji ini merupakan reaksi kimiawi model dengan meniru suasana pada sel hidup (eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium sp.*). Pada sel hidup banyak faktor lain yang mempengaruhi aktivitas antiplasmodium, misalnya kelarutan obat dalam lemak yang akan mempengaruhi absorpsi dan penetrasi obat ke dalam eritrosit dan parasit. Pada reaksi kimiawi hal ini tidak terjadi.

Ada faktor lain yang juga berpengaruh pada uji dengan menggunakan metode ini. Faktor tersebut adalah warna dan pH ekstrak. Pencucian yang tidak bersih akan mempengaruhi absorbansi yang diukur pada *Elisa Reader*. Reaksi kimia terbentuknya kristal hematin membutuhkan pH yang rendah, sedangkan pH ekstrak yang mungkin tinggi akan meningkatkan pH sehingga kristal hematin tidak terbentuk. Kesemua faktor ini akan mempengaruhi hasil pembacaan pada *Elisa Reader*.

Baelsman *et al.* (2000) menyebutkan jika IC<sub>50</sub> yang didapat dari uji penghambatan polimerisasi pada kloroquinsulfat lebih dari 37,5 mM (12 mg/mL) maka dapat dikategorikan tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Berdasarkan kriteria ini maka ekstrak air dapat dikatakan tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Hal ini dapat saja terjadi karena mekanisme kerja pada ekstrak air, mungkin bukan melalui penghambatan polimerisasi hem tetapi ada mekanisme kerja lain yang mengakibatkan *P. falciparum* terhambat pertumbuhannya (Basilico, *et al.*, 1998; Macreadie, *et al.*, 2000)

#### 4. KESIMPULAN

Ekstrak aseton dan etanol daun *P. canescens* memiliki kemampuan menghambat polimerisasi hem *in vitro*. Aktivitas penghambatan paling baik terdapat pada ekstrak aseton



dengan nilai  $IC_{50}$   $0,40 \pm 0,17$  mg/mL. Ekstrak air memiliki kemampuan penghambatan polimerisasi hem yang rendah dengan nilai  $IC_{50}$   $53,89 \pm 29,47$  mg/mL.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., Ph.D selaku Kepala Bagian Parasitologi FK-UGM; kepada Prof.dr. Soesanto Tjokrosonto, M.CommH., M.Sc., DTM&H., DLSHTM., Ph.D., Sp.ParK selaku Ketua Pengelola PS. S2 IKD & Biomedik; kepada dr. Didik Guntoro, M.Kes, dokter pada RS. Bukit Asam Tanjung Enim; Dr. John Hendri, M.Si selaku Ketua LP-UNILA yang telah memberikan kesempatan untuk mendapatkan dana penelitian DIPA PNBPN UNILA; Bapak Wakil Gubernur Propinsi Sumatera Selatan dr. Mahyudin NS, SpOG dan pemerintah Propinsi Sumatera Selatan yang telah membantu sebagian dana untuk penelitian ini; Bapak Purwono yang telah memberikan pendampingan yang baik selama penelitian serta kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.



# PROC 01

## ORIGINALITY REPORT

44%

SIMILARITY INDEX

### PRIMARY SOURCES

1	<a href="https://media.neliti.com">media.neliti.com</a> Internet	263 words — 11%
2	<a href="http://ikahimkiwilayahvi.blogspot.com">ikahimkiwilayahvi.blogspot.com</a> Internet	178 words — 8%
3	<a href="http://jurnal.fmipa.unila.ac.id">jurnal.fmipa.unila.ac.id</a> Internet	118 words — 5%
4	<a href="http://dokumen.tips">dokumen.tips</a> Internet	83 words — 4%
5	<a href="http://eprints.ums.ac.id">eprints.ums.ac.id</a> Internet	79 words — 3%
6	<a href="http://pasca.unhas.ac.id">pasca.unhas.ac.id</a> Internet	68 words — 3%
7	<a href="http://devyanablog.wordpress.com">devyanablog.wordpress.com</a> Internet	56 words — 2%
8	<a href="http://jurnal.unej.ac.id">jurnal.unej.ac.id</a> Internet	39 words — 2%
9	<a href="http://journal.uad.ac.id">journal.uad.ac.id</a> Internet	33 words — 1%
10	<a href="http://junikomang.blogspot.com">junikomang.blogspot.com</a> Internet	25 words — 1%
11	<a href="https://pt.scribd.com">pt.scribd.com</a> Internet	24 words — 1%

12	<a href="http://repository.usu.ac.id">repository.usu.ac.id</a> Internet	18 words — 1%
13	<a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Internet	16 words — 1%
14	<a href="http://eprints.uny.ac.id">eprints.uny.ac.id</a> Internet	9 words — < 1%
15	<a href="http://docplayer.info">docplayer.info</a> Internet	8 words — < 1%
16	<a href="http://www.teknolabjournal.com">www.teknolabjournal.com</a> Internet	8 words — < 1%
17	<a href="http://docobook.com">docobook.com</a> Internet	8 words — < 1%

EXCLUDE QUOTES OFF  
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY OFF

EXCLUDE MATCHES OFF