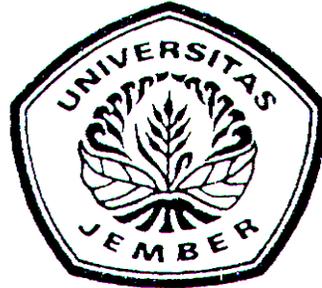


**EXECUTIVE SUMMARY
HIBAH BERSAING**



**STUDI FITOKIMIA *IRVINGIA MALAYANA* SEBAGAI ANTIMALARIA DARI
HUTAN MERU BETIRI DALAM RANGKA *DRUG DISCOVERY***

Tahun II

Oleh :

**AYIK ROSITA PUSPANGTYAS, S.FARM.,M.FARM., APT (0001028102)
IKA PUSPITA DEWI, S.FARM, M.BIOMED, APT (0013068401)**

**UNIVERSITAS JEMBER
OKTOBER, 2016**

STUDI FITOKIMIA *IRVINGIA MALAYANA* SEBAGAI ANTIMALARIA DARI HUTAN MERU BETIRI DALAM RANGKA *DRUG DISCOVERY*

Puspaningtyas, A.R, Dewi, I.P

Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember

Corresponding author. Email : aixrose_pee@yahoo.co.id, Tel/Fax : 08123473390/0331-324736

Abstrak

Meru betiri adalah hutan di daerah Kabupaten Jember yang banyak mengandung tanaman obat. Salah satunya adalah tanaman *Irvingia malayana* (Pauh Kijang) yang telah terbukti berdasarkan penelitian sebagai antimalaria. Pada penelitian yang dilakukan oleh Chairul dan Pratiwi (2008) ekstrak dari tanaman *Irvingia malayana* memberikan pengaruh antimalaria cukup signifikan pada *Plasmodium berghei*. Informasi ilmiah lainnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun tumbuhan Pauh Kijang (konsentrasi 10 µg/mL) memiliki efek farmakologi sebagai antimalaria dengan hambatan sebesar 95% terhadap *Plasmodium falciparum* FcB. Namun studi fitokimia dengan mengisolasi tanaman *Irvingia malayana* belum pernah dilakukan, sehingga belum diketahui pasti senyawa aktif mana yang bermanfaat sebagai antimalaria. Pada penelitian ini dilakukan suatu pencarian obat baru (*Drug Discovery*) untuk antimalaria melalui studi fitokimia dengan cara mengisolasi akar, batang dan daun tanaman *Irvingia malayana*. Dari studi fitokimia akan didapatkan senyawa tunggal murni yang akan diidentifikasi struktur dan diuji aktivitasnya sebagai antimalaria baik *in vitro* maupun *in vivo*. Identifikasi stuktur dilakukan dengan FTIR, NMR, maupun GC-MS.

Dari hasil analisis di Tahun I menggunakan FTIR, H-NMR, dan GC-MS maka disimpulkan senyawa hasil isolasi merupakan senyawa terpenoid pada batang pada ekstrak etil asetat dan kemungkinan golongan silimarin seperti halnya tanaman lain dalam genus *Irvingia*. Untuk jarak lebur senyawa yaitu 120-121°C. Hasil penelitian menunjukkan dugaan golongan silimarin karena berupa kristal putih yang hampir sama satu golongan genus *Irvingia*. Untuk tahap selanjutnya di tahun II dilakukan uji aktivitas antimalarial secara *in vitro* dan *in vivo*. Pada Uji *in vivo* berdasarkan analisis anova one way menunjukkan bahwa masing masing kelompok berbeda bermakna. Hal ini dikarenakan data biologis *in vivo* memberikan hasil yang cukup kompleks. Untuk uji probit didapatkan IC₅₀ masing masing hari pada derajat parasetemianya. Pada hari 4 setelah pemberian menunjukkan IC₅₀ yaitu 11,827 mg/kgBB dibandingkan hari 3 (6,927 mg/kgBB) yang artinya aktivitas malariannya lebih baik pada hari 3 daripada hari 4. Oleh karena itu pada hari ke 3 adalah maksimal lama pemberian yang memberikan efek maksimum daripada hari selanjutnya dalam menurunkan plasmodiumnya. Dengan demikian dari dosis IC₅₀ 6,927 mg/kgBB menunjukkan sangat baik aktivitasnya sebagai antimalaria berdasarkan klasifikasi uji antimalaria. Dari hasil uji *in vitro* setelah dilakukan analisis probit didapatkan IC₅₀ isolat *Irvingia malayana* yaitu 62,855 µg/ml dimana dapat disimpulkan berdasarkan klasifikasinya memiliki aktivitas antiplasmodium lemah. Jika dibandingkan kontrol positif klorokuin aktivitasnya lebih kecil karena IC₅₀ klorokuin 1,114x10⁻³ µg/ml. Berdasarkan data uji aktivitas *in vivo* dan *in vitro* antimalaria menunjukkan bahwa isolat kurang memberikan aktivitas antimalaria meskipun pada uji *in vivo* dengan menggunakan jenis plasmodium yang sama pada ekstrak *Irvingia malayana* menunjukkan hasil yang cukup signifikan dalam menurunkan jumlah plasmodiumnya dikarenakan pada ekstrak yang terdiri dari komponen yang cukup banyak kemungkinan ada mekanisme kerja obat antimalaria secara sinergisme dibandingkan isolat yang terdiri dari senyawa tunggal.

Keyword : antimalaria, *Irvingia malayana*, fitokimia, *Drug Discovery*, *in vivo*, *in vitro*

Abstract

Meru Betiri is a forest in the Jember that contains a lot of medicinal plants. One of them is *Irvingia malayana* (Pauh Kijang) which has been proven by research as an antimalarial. In the study conducted by Chairul and Pratiwi (2008) extracts of plant *Irvingia malayana* provide significant antimalarial effect on *Plasmodium berghei*. Other scientific information indicates that the methanol extract of leaves of plants Pauh Kijang (concentration of 10 ug/mL) have pharmacological effects as antimalarial with 95% inhibition against *Plasmodium falciparum* FcB1. But a study of phytochemicals with isolating plant *Irvingia malayana* has never been done, so it was unclear where the active compounds that are useful as an antimalarial. In this study conducted a search for new drugs (Drug Discovery) for antimalarials through phytochemical studies by isolating the roots, stems and leaves of the plant *Irvingia malayana*. Phytochemical studies will be obtained from a pure single compound that will be identified and tested structure as antimalarial activity both *in vitro* and *in vivo*. Identification of the structure was done by FTIR, NMR, and GC-MS. From the analysis in the first year using FTIR, H-NMR, and GC-MS, we conclude isolated compounds were compounds terpenoids in the ethyl acetate extract that was possibilities silymarin group as well as other plants in the genus *Irvingia*. For a distance of melting point was 120-121°C. The results showed the alleged class of silymarin for the form of white crystals which was almost the same one genus *Irvingia* group. In the second year, the study was antimalarial activity *in vitro* and *in vivo*. In the *in vivo* study was based on statistically showed that each group was significantly different. This was because the *in vivo* biological data provide results that are quite complex. IC₅₀ from the degree of parasitemia obtained each day. On day 4 after administration showed IC₅₀ (11,827 mg/kgbw) compared to day 3 (6,927 mg/kg bw), which means better malaria activity on 3 day than 4 day. Therefore, on day 3 is the maximum duration of administration that provides maximum effect than the next day in reducing of plasmodium. Thus the IC₅₀ 6,927 mg/kg showed excellent activity as antimalarial based classification study. From *in vitro* study, IC₅₀ of *Irvingia malayana* obtained 62.855 ug/ml which can be inferred based classification that has weak activity of antiplasmodium and less activity that compared with positive controls chloroquine that has IC₅₀ (1,114x10⁻³ ug/ml). Based on the research data of activity *in vivo* and *in vitro* antimalarial showed that the compound less provide antimalarial activity despite the *in vivo* tests was using species of plasmodium same in the extract *Irvingia malayana*. The compounds showed a significant result in reducing the number of plasmodium because the extract consists of many components that were many possible mechanism of action of antimalarial drugs by the synergism compared to the compounds which consists of a single compound.

Keyword: antimalarials, *Irvingia malayana*, phytochemicals, Drug Discovery, *in vivo*, *in vitro*

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit tropis yang banyak tersebar merata di beberapa kawasan di Indonesia. Daerah endemik malaria terbanyak berada di luar pulau Jawa, dimana masih banyak hutan-hutan tropis di Indonesia yang menjadi daerah rawan malaria. Selama periode 2000 – 2004, angka endemis malaria di seluruh Indonesia cenderung menunjukkan peningkatan. Di Pulau Jawa dan Bali, *Annual Parasite Incidence* (API) selama periode waktu 1995 – 2000 per 1000 penduduk meningkat pesat dari 0,07 (1995), 0,08 (1996), 0,12 (1997), 0,30 (1998), 0,52 (1999), dan 0,81 (2000). KLB (Kejadian Luar Biasa) malaria selama periode 1998-2003 telah menyerang di 15 propinsi yang meliputi

84 endemis dengan jumlah penderita 27.000 dengan 368 kematian (Erdial,dkk, 2006). Bila dilihat per provinsi dari tahun 2008 – 2009 provinsi dengan API yang tertinggi adalah Papua Barat, NTT dan Papua terdapat 12 provinsi yang diatas angka API nasional. (Direktorat Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang, 2011; Centers for Disease Control and Prevention, 2010; World Health Organization, 2011).

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit golongan Plasmodium dimana jenis yang sering rentan terjadi resistensi yaitu *Plasmodium falcifarum* dan menjadi suatu permasalahan tersendiri bagi Indonesia. Upaya yang dapat dilakukan bagi penderita malaria yaitu pengobatan sekaligus pencegahan berupa pemberantasan malaria itu sendiri. Disamping tingginya beberapa kasus malaria di Indonesia, masalah lain yang menghantui saat ini adalah resistensi *Plasmodium* terhadap obat klorokuin. Kasus resistensi pertama kali ditemukan di Thailand pada tahun 1962. Kasus resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin di Indonesia pertama kali dilaporkan pada tahun 1973 di Kalimantan Timur. Sejak itu kasus resistensi dilaporkan semakin meluas. Tahun 1990 dilaporkan telah terjadi kasus resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin di seluruh provinsi di Indonesia. Pengobatan malaria khususnya *P. falciparum* di Indonesia mulai tahun 2004 berdasarkan kebijakan Depkes harus menggunakan obat baru kombinasi derivat artemisinin yang dikenal dengan *artemisinin combination therapy* (ACT), salah satunya yaitu artesunat-amodiakuin (artesdiakuin) sesuai rekomendasi dari WHO. Pengobatan itu sendiri tak lantas membuat kasus malaria terselesaikan seutuhnya, mengingat begitu pesatnya penyebaran wabah (Bunnag D., *et al*, 1997; Santoso, 2011).

Saat ini telah banyak ditemukan obat antimalaria yang resisten, untuk itu timbul pemikiran kami untuk melakukan penelitian dalam pengembangan obat baru (*Drug Discovery*) yang berasal dari alam untuk digunakan sebagai alternatif pengobatan antimalaria. Kekayaan sumber daya alam di Indonesia juga mendorong kami untuk turut mencari solusi bagi pengobatan malaria dalam pengembangan obat yang berasal dari tanaman. Meru betiri adalah hutan di daerah Kabupaten Jember yang banyak mengandung tanaman obat. Salah satunya adalah tanaman *Irvingia malayana* (Pauh Kijang) yang telah terbukti berdasarkan penelitian sebagai antimalaria. Pauh kijang (*Irvingia malayana*) telah dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari antara lain kayunya dimanfaatkan sebagai bahan bangunan sedang lemak dari bijinya digunakan pada pembuatan sabun dan lilin (Nooteboom, 1972). Selain itu Family Simarubaceae terkenal sebagai obat antimalaria dan *Irvingia malayana* merupakan salah satu anggotanya yang belum diteliti secara mendalam studi fitokimianya sebagai antimalaria. Pada penelitian yang dilakukan oleh Chairul dan Praptiwi (2008) menggunakan ekstrak dari tanaman *Irvingia malayana* memberikan pengaruh antimalaria cukup signifikan pada *Plasmodium berghei*. Informasi ilmiah lainnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun tumbuhan Pauh Kijang

(konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) memiliki efek farmakologi sebagai antimalaria dengan hambatan sebesar 95% terhadap *Plasmodium falciparum* FcB1 (Pouplin *et al.*, 2007). Namun studi fitokimia dengan mengisolasi tanaman *Irvingia malayana* belum pernah dilakukan, sehingga belum diketahui pasti senyawa aktif mana yang bermanfaat sebagai antimalaria (Praptiwi dan Chairul, 2008; Phillipson J.D, *et al.*, 1995; Wright, CW, 2005).



Gambar 1. Tanaman *Irvingia malayana*

Pada penelitian ini dilakukan suatu pencarian obat baru (*Drug Discovery*) untuk antimalaria melalui studi fitokimia dengan cara mengisolasi akar, batang dan daun tanaman *Irvingia malayana*. Dari studi fitokimia akan didapatkan beberapa senyawa tunggal murni yang akan diidentifikasi struktur dan diuji aktivitasnya sebagai antimalaria baik *in vitro* maupun *in vivo*. Identifikasi stuktur dilakukan dengan FTIR, NMR, maupun GC-MS. Hasil akhir penelitian ini yaitu dari beberapa senyawa tunggal murni yang memiliki aktivitas antimalaria paling besar dapat dijadikan *lead compounds* baru dalam pengobatan malaria.

Pada akhirnya diharapkan pada penelitian ini dapat menyumbangkan pengetahuan dalam bentuk publikasi ilmiah Nasional Terakreditasi maupun Internasional serta Hak Paten. Di samping itu tujuan jangka panjang yaitu sebagai salah satu langkah untuk menekan angka kejadian malaria di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Alat

Mikroskop dengan *camera digital*, kaca obyek, kaca penutup, kertas label, alat tulis, timbangan analitik, *Laminar Air Flow Cabinet*, Inkubator CO₂ (Heraceus), sentrifus (Universal 320 R Hettich), sonikator, *laminar air flow cabinet* Esco Class II BSC, mikropipet (Gilson), autoklaf, hemositometer (Nebauer), mikroskop *inverted* (Olympus CH-2), mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80), kamera digital (Canon Power Shoot S 40, 4,0 mega pixels), Multi Mikropipet Biorad, alat suntik, stopwatch, hot plate, beakerglass, timbangan hewan, termometer, Mikroplate, slide.

Bahan

Mencit, *Plasmodium falciparum* FCR3, RBC, minyak emersi, alkohol, kapas, CMC Na, Trisodium sitrat, asam sitrat, sorbitol, NaCl, hydrogen peroksidase dalam metanol, RPMI 1640, HEPES, Natirum Bikarbonat 90%, Hypoxantin, Gentamycin, Aqua, Serum 10%, Giemsa 20% dalam aqua, Garamfisiologis, AlbuMAX II (invitrogen), etanol, dimetil sulfoksida (Fluka), H₂O *buffer* (pH 6,8), aseton (Merck), Isolat *Irvingia malayana*.

Uji *in vivo* aktivitas antimalaria *Plasmodium berghei*

Uji variasi dosis

Berdasarkan uji dosis tunggal maka senyawa (isolat tanaman *Irvingia malayana*) yang paling efektif dalam menurunkan parasit *P. berghei* diuji lebih lanjut dengan berbagai variasi dosis. Pada uji ini mencit positif terinfeksi *P. berghei* dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit. Dosis yang digunakan adalah 1, 10, dan 100 mg/kg BB. Pada uji variasi dosis juga digunakan kelompok kontrol negatif (CMC 1%), sedang kontrol positif adalah klorokuin 25 mg/kg BB. Tingkat parasitemia awal dihitung dengan mengambil darah dari ekor untuk dibuat preparat apus seperti pada pemberian dosis tunggal. Selanjutnya setelah pemberian isolat, darah diambil setiap hari selama 4 hari berturut-turut untuk dibuat preparat apus dan dihitung tingkat parasitemianya (Kim H-S., *et al*, 2000, Anonim, 2016).

Uji *in vitro* aktivitas antimalaria *Plasmodium falciparum*

Aktivitas *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* pada tahap *intraerythrocytic* menggunakan isolat tanaman *Irvingia malayana* dievaluasi dengan cara Mark III tes, seperti yang dikembangkan oleh WHO. Strain *P. falciparum* FCR3 yang dibudidayakan dalam eritrosit baru dikumpulkan sebagai sel inang dalam media RPMI 1640 (Gibco) mengandung HEPES 25 mM (Sigma) dan 6,8 M hipoksantin (Sigma) ditambah dengan 0,5% AlbuMAX II (invitrogen). Kultur disimpan pada suhu 37°C. Isolat tanaman *Irvingia malayana* dilarutkan dalam etanol atau dimetil sulfoksida (DMSO) dan diencerkan dalam RPMI. Mikro *plate* dititiasi dengan dua kali lipat pengenceran setiap isolat tanaman *Irvingia malayana* serta kontrol. Strain berlapis (di duplikat) tersebut disinkronkan pada cincin-tahap parasit dengan parasitemia antara 0,6-0,8%. Jumlah masing-masing terukur dengan baik yakni 10 µL eritrosit yang mengandung parasit, hematokrit 5%, dan 90 µL pengenceran obat yang berbeda. Lempeng diinkubasi pada suhu 37° C selama 20-24 jam, setelah dinyatakan positif terdapat *schizonts* matang dalam sumur sampel kontrol (tanpa obat). Pada akhir proses ini, darah dari setiap sumur dipanen, dan film tebal disiapkan. Film-film yang dicampur dengan metanol dan menunjukkan noda selama 60 menit di Giemsa *stain* pada pengenceran dari 1% dalam H₂O *buffer* (pH 6,8). Tiga independen mikroskop

optik perbesaran 100 kali digunakan dalam pembacaan jumlah *schizonts* dengan tiga atau lebih inti yang dilakukan di 200 sel darah merah parasitoid untuk pengenceran masing-masing dan duplikat. Penghambatan pertumbuhan dinyatakan sebagai persen dari jumlah *schizonts* untuk masing-masing konsentrasi, dibandingkan dengan kontrol yang tidak diobati. Nilai IC₅₀ dihitung dari kurva dosis-respon (persentase *schizonts* vs logaritma dari konsentrasi obat) dengan interpolasi linier. Klorokuin digunakan sebagai kontrol positif (Desjardins, R. E., *et al.* 1979).

Analisis Data

Terhadap data yang diperoleh, dilakukan analisis statistik *Anava* (analisis varians) satu arah. Untuk menilai hipotesis statistik, terlebih dahulu ditentukan harga p hitung yang akan dibandingkan dengan harga tingkat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) dan dilanjutkan dengan LSD untuk melihat perbedaan bermakna yang bermakna antar kelompok dengan harga $p \leq 0,05$ dimana untuk mengetahui pengaruh penambahan pemberian sampel (isolat *Irvingia malayana*) terhadap kontrol positif dan kontrol negatif

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dan Pembahasan Uji *in vivo* aktivitas antimalaria *Plasmodium berghei*

Tahapan penelitian uji aktivitas antimalaria terhadap isolat pada tahun II dimulai dengan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* dikarenakan untuk uji *in vitro* menggunakan *Plasmodium falcifarum* FCR3 selama penumbuhannya masih terkendala kontaminasi sehingga yang dilakukan uji antimalaria secara *in vivo* terlebih dahulu. Dari hasil uji antimalaria secara *in vivo* mencit positif terinfeksi *P. berghei* dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 3 mencit. Dosis yang digunakan adalah 1, 10, dan 100 mg/kg BB. Pada uji variasi dosis juga digunakan kelompok kontrol negatif (CMC 1%), sedang kontrol positif adalah klorokuin 25 mg/kg BB. Tingkat parasitemia awal dihitung dengan mengambil darah dari ekor untuk dibuat preparat apus. Selanjutnya setelah pemberian isolat, darah diambil setiap hari selama 4 hari berturut-turut untuk dibuat preparat apus dan dihitung tingkat parasitemianya. Berikut data hasil parasitemia uji *in vivo* isolat *Irvingia malayana*

Tabel 1. Data Derajat Parasitemia uji antimalaria *in vivo* isolat *Irvingia malayana*

NO	PERLAKUAN	H0(%)	H1 (%)	H2(%)	H3(%)	H4(%)	rata-rata H0	rata-rata H1	rata-rata H2	rata-rata H3	rata-rata H4
1.	KONTROL NEGATIF 1	0.1	1.3	2.1	6.5	7.4	0.10	0.73	2.50	4.23	5.10
2.	KONTROL NEGATIF 2	0.1	0.4	5.1	5.3	5.9					
3.	KONTROL NEGATIF 3	0.1	0.5	0.3	0.9	2					
4.	KONTROL POSITIF 1	0.3	0.7	0.4	0.4	0.4	0.23	0.57	0.47	0.37	0.33
5.	KONTROL POSITIF 2	0.3	0.4	0.7	0.4	0.3					
6.	KONTROL POSITIF 3	0.1	0.6	0.3	0.3	0.3					
7.	DOSIS ISOLAT 1mg/kgBB 1	0.1	0.7	0.5	4.2	7.2	0.13	1.83	5.00	5.33	6.60
8.	DOSIS ISOLAT 1mg/kgBB 2	0.2	1.1	5.9	7	4.1					
9.	DOSIS ISOLAT 1mg/kgBB 3	0.1	3.7	8.6	4.8	8.5					
10.	DOSIS ISOLAT 10mg/kgBB 1	0.1	1.6	13.7	15.1	12.9	0.13	0.77	8.50	11.87	9.43
11.	DOSIS ISOLAT 10mg/kgBB 2	0.2	0.6	6.3	10.8	6.7					
12.	DOSIS ISOLAT 10mg/kgBB 3	0.1	0.1	5.5	9.7	8.7					
13.	DOSIS ISOLAT 100mg/kgBB 1	0.2	0.9	6	19.8	17.5	0.23	0.93	6.60	14.40	11.00
14.	DOSIS ISOLAT 100mg/kgBB 2	0.3	1.1	5.7	14.3	7.8					
15.	DOSIS ISOLAT 100mg/kgBB 3	0.2	0.8	8.1	9.1	7.7					

Tabel 2. Data IC₅₀ uji *in vivo* antimalaria isolat *Irvingia malayana*

Hari	IC ₅₀ (mg/kgBB)
0	32.360
1	-
2	25.781
3	6.927
4	11.827

Berdasarkan analisis anova one way menunjukkan bahwa masing masing kelompok berbeda bermakna. Hal ini dikarenakan data biologis *in vivo* memberikan hasil yang cukup kompleks. Untuk uji probit didapatkan IC₅₀ masing masing hari pada derajat parasitemianya. Pada hari 4 setelah pemberian menunjukkan IC₅₀ yaitu 11.827 mg/kgBB dibandingkan hari 3 (6.927 mg/kgBB) yang artinya aktivitas malariannya lebih baik pada hari 3 daripada hari 4. Oleh karena itu pada hari ke 3 adalah maksimal lama pemberian yang memberikan efek maksimum daripada hari selanjutnya dalam menurunkan plasmodiumnya. Dengan demikian dari dosis IC₅₀ 6.927 mg/kgBB menunjukkan sangat baik aktivitasnya sebagai antimalaria. IC₅₀ adalah konsentrasi yang membunuh 50% *Plasmodium* setelah

diberi sampel uji dimana klasifikasinya IC₅₀ dengan konsentrasi ≤ 10 µg/ml sangat baik aktivitasnya, 10-50 µg/ml aktivitas sedang, dan > 50 µg/ml sangat lemah aktivitasnya. (Gessler *et al.*, 1994).

Berdasarkan data uji aktivitas *in vivo* antimalaria menunjukkan bahwa isolat kurang memberikan aktivitas antimalaria meskipun pada uji *in vivo* dengan menggunakan jenis plasmodium yang sama pada ekstrak *Irvingia malayana* menunjukkan hasil yang cukup signifikan dalam menurunkan jumlah plasmodiumnya dikarenakan pada ekstrak yang terdiri dari komponen yang cukup banyak kemungkinan ada mekanisme kerja obat antimalaria secara sinergisme dibandingkan isolat yang terdiri dari senyawa tunggal.

Hasil dan Pembahasan Uji *in vitro* aktivitas antimalaria *Plasmodium falcifarum*

Pertama dilakukan thawing terhadap Plasmodium beku yang diambil dari nitrogen cair. **Thawing *P. falcifarum*.** *P. falcifarum* yang digunakan adalah FCR3 (resisten terhadap klorokuin) yang didapatkan di Eijkman Jakarta. Ampul yang mengandung strain *falcifarum* diambil dari tabung nitrogen kemudian dihangatkan pada waterbath 37⁰C hingga cair. Isi ampul dipindah ke *conical tube* kemudian ditambah tetes demi tetes larutan NaCl 3,5 % dengan perbandingan (1:1) sambil digoyang-goyang kemudian ditambah RPMI sampai 10 ml. Kemudian disentrifugasi 7000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan RPMI dan serum manusia golongan O kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37⁰C dan posisi *culture flask* tegak untuk pertumbuhan plasmodium.

Yang kedua yaitu **Pembuatan kultur.** FCR3 dan D10 dibiakkan dalam *candle jar*. Sel darah merah yang terinfeksi parasit dibiakkan dalam kultur flask yang mengandung 10 ml medium komplit (mengandung 10% serum) dengan hematokrit akhir 1,5%. Kultur parasit dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dalam kondisi steril kemudian diinkubasi di inkubator CO₂ pada temperatur 37⁰C. medium diganti dengan baru setiap 24 jam masa inkunbasi (Desjardins *et al.*, 1979).

Yang ketiga yaitu **Sinkronisasi.** Sinkronisasi untuk memperoleh stadium ring. Kultur parasit ditambah sorbitol 5% dan disentrifugasi selama 10 menit 1500 rpm, supernatan dibuang kemudian endapan parasit direndam dalam larutan sorbitol 5% steril sebanyak 3 volume parasit dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Parasit dicuci dengan disentrifugasi setelah ditambah medium komplit sebanyak 5 kali volume endapan parasit yang hanya terdiri dari stadium cincin diperoleh dan parasit dikembalikan ke *culture flask* (Desjardins *et al.*, 1979).

Yang keempat yaitu **Persiapan mikrokultur.** Isolat *Irvingia malayana* ditambah DMSO 100 µl dan medium RPMI 1640 hingga volume 1 ml (stok) kemudian diencerkan dengan RPMI. Mikrokultur yang digunakan mempunyai 96 sumuran. Masing masing sumuran diisi dengan 100 µl medium komplit yang mengandung parasit dengan hematokrit 1,5% dan parasitemia 2%. Larutan uji steril disiapkan

dengan menggunakan mikropipet 100 µl masing-masing konsentrasi dipindahkan ke dalam sumuran mulai dari konsentrasi rendah ke tinggi. Sedangkan pada kontrol ditambahkan RPMI sebanyak 100 µl (triplo). Mikrokultur diletakkan di dalam kotak desikator hampa udara dengan *candle jar*. Desikator ditutup rapat pada waktu nyala lilin didalamnya akan mati kemudian diinkubasi di incubator CO₂ 37⁰C, 72 jam. (Desjardins *et al.*, 1979).

Evaluasi hasil. Setelah parasit diinkubasi 72 jam lempeng sumur mikro dikeluarkan dari *candle jar*. Sediaan uji dicampur homogen dan disentrifugasi filtrat dibuang dan bagian yang pekat dibuat sediaan apusan. Apusan dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol 80% dan setelah kering diwarnai dengan larutan giemsa 10% dalam aquades selama 30 menit. Evaluasi tiap sumuran baik kontrol maupun perlakuan dengan senyawa uji dihitung % parasitemia dengan membandingkan eritrosit terinfeksi parasite dari sekitar 1000 eritrosit.

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{parasitemia kontrol} - \text{parasitemia obat}}{\text{parasitemia kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dianalisis probit. Klorokuin digunakan sebagai kontrol positif. IC₅₀ adalah konsentrasi yang membunuh 50% *Plasmodium falcifarum* setelah diberi sampel uji dimana klasifikasinya IC₅₀ dengan konsentrasi ≤ 10 µg/ml sangat baik aktivitasnya, 10-50 µg/ml aktivitas sedang, dan > 50 µg/ml sangat lemah aktivitasnya. (Gessler *et al.*, 1994; Fidock *et al.*, 2004).

Dari hasil uji *in vitro* setelah dilakukan analisis probit didapatkan IC₅₀ isolat *Irvingia malayana* yaitu 62,855 µg/ml dimana dapat disimpulkan berdasarkan klasifikasinya memiliki aktivitas antiplasmodium lemah. Jika dibandingkan kontrol positif klorokuin aktivitasnya lebih kecil karena IC₅₀ klorokuin 1,114x10⁻³ µg/ml. Hal ini dikarenakan proses pencarian isolat tidak berdasarkan *Bioassay guided* selama proses isolasi namun berdasarkan jumlah mayor senyawa murni yang ada dalam tanaman yaitu batang tanaman *Irvingia malayana* sehingga meskipun jumlah mayor senyawa murninya namun ternyata pada aktivitas antiplasmodiumnya secara *in vitro* lebih kecil dibandingkan dengan klorokuin sebagai kontrol positif. Hasil uji *in vitro* antimalaria/antiplasmodium dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persen pertumbuhan parasit, persen penghambatan dan IC50 isolat *Irvingia malayana* (IM) terhadap *Plasmodium falcifarum* FCR3

Konsentrasi (µg/ml)	Replikasi	% parasit (72 jam) rata-rata	% pertumbuhan	%hambatan	IC ₅₀
Kontrol negatif	1	2.528	2.528	-	-
	2	2.261			
	3	2.794			
IM 1	1	1.605	2.197	13.089	62,855 µg/ml
	2	2.385			
	3	2.6			
IM 50	1	0.475	0.458	81.866	
	2	0.5			
	3	0.4			
IM 250	1	0.3	0.467	81.536	
	2	0.7			
	3	0.4			
IM 500	1	0.2	0.467	81.536	
	2	0.5			
	3	0.7			
IM 1000	1	0.2	0.392	84.491	
	2	0.39			
	3	0.586			
Klorokuin (kontrol +) 1	1	0.4	0.396	84.319	1,114x10 ⁻³ µg/ml
	2	0.3			
	3	0.489			
Klorokuin 50	1	0.4	0.367	85.493	
	2	0.1			
	3	0.6			
Klorokuin 250	1	0.3	0.430	82.974	
	2	0.591			
	3	0.4			
Klorokuin 500	1	0.2	0.551	78.213	
	2	0.952			
	3	0.5			
Klorokuin 1000	1	0	0.000	100.000	
	2	0			
	3	0			

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penelitian pada tahun kedua yaitu :

1. Pada Uji *in vivo* berdasarkan analisis *anova one way* menunjukkan bahwa masing masing kelompok berbeda bermakna. Hal ini dikarenakan data biologis *in vivo* memberikan hasil yang cukup kompleks. Untuk uji probit didapatkan IC₅₀ masing masing hari pada derajat parasetemianya. Pada hari 4 setelah pemberian menunjukkan IC₅₀ yaitu 11.827 mg/kgBB dibandingkan hari 3 (6.927 mg/kgBB) yang artinya aktivitas malariannya lebih baik pada hari 3 daripada hari 4. Oleh karena itu pada hari ke 3 adalah maksimal lama pemberian yang memberikan efek maksimum daripada hari selanjutnya dalam menurunkan plasmodiumnya. Dengan demikian dari dosis IC₅₀ 6.927 mg/kgBB menunjukkan sangat baik aktivitasnya sebagai antimalaria berdasarkan klasifikasi uji antimalaria.

Berdasarkan data uji aktivitas *in vivo* antimalaria menunjukkan bahwa isolat kurang memberikan aktivitas antimalaria meskipun pada uji *in vivo* dengan menggunakan jenis plasmodium yang sama pada ekstrak *Irvingia malayana* menunjukkan hasil yang cukup signifikan dalam menurunkan jumlah plasmodiumnya dikarenakan pada ekstrak yang terdiri dari komponen yang cukup banyak kemungkinan ada mekanisme kerja obat antimalaria secara sinergisme dibandingkan isolat yang terdiri dari senyawa tunggal.

2. Dari hasil uji *in vitro* setelah dilakukan analisis probit didapatkan IC50 isolat *Irvingia malayana* yaitu 62,855 µg/ml dimana dapat disimpulkan berdasarkan klasifikasinya memiliki aktivitas antiplasmodium lemah. Jika dibandingkan kontrol positif klorokuin aktivitasnya lebih kecil karena IC50 klorokuin $1,114 \times 10^{-3}$ µg/ml. Hal ini dikarenakan proses pencarian isolat tidak berdasarkan *Bioassay guided* selama proses isolasi namun berdasarkan jumlah mayor senyawa murni yang ada dalam tanaman yaitu batang tanaman *Irvingia malayana* sehingga meskipun jumlah mayor senyawa murninya namun ternyata pada aktivitas antiplasmodiumnya secara *in vitro* lebih kecil dibandingkan dengan klorokuin sebagai kontrol positif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Universitas Jember melalui DP2M Tahun Anggaran 2016 yang telah mendanai Program Penelitian Desentralisasi Hibah Bersaing ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2016, Laboratory for experimental botany, University of LJUBLJAWA, Slovenia, <http://botanika.biologija.org/exp/comet/>, diakses tanggal 6 juni 2016
- Bunnag D, Kanda T, Karbwang J, Thimasarn K, Pungpak S. 1997. Two doses of artemether/mefloquine or artesunate/mefloquine combination for multidrug resistant *Falciparum* malaria. *Southeast As J Trop Med Pub Health*; 28:727-35.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Where Malaria Occurs. <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. Diakses pada 29 September 2012
- Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D., Chulay, J. D. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 710-718
- Direktorat Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang. 2011. Epidemiologi di Indonesia. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*.1 : 1 – 16.
- Donfack, J.H., Fotso, G.W., Ngameni, B., Tsofack, F.N., Tchoukoua, A., Ambassa, P., Abia, W., Tchana, A.N., Giardina, S., Buonocore, D., Finzi, P.V., Vidari, G., Marzatico, F., Ngadjui, T., and Moundipa, P.F., 2010, *In Vitro* Hepatoprotective And Antioxidant Activities Of The Crude Extract And Isolated Compounds From *Irvingia Gabonensis*, *Asian Journal of Traditional Medicines*, 5 (3) pp 79-88
- Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R., Nwaka, S., 2004, Antimalarial drug discovery : Efficacy models for compounds screening, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 509-520
- Gessler, MC., Nkunya, M.H.N., Nwasumbi, L.B., Heinrich, M. and Tonner, M, 1994. Screening Tanzanian medical plants for antimalarial activity. *Acta Tropica*, 55, pp 65-67

- Ikhatua, M.I and Falodun, A, 2012, The Essential Oil Components Of *Irvingia Gabonensis* And *Irvingia wombolu* From Southern Nigeria, Canadian Journal of Pure and Applied Sciences Vol. 6, No. 2, pp. 1955-1959
- Jayaselli, Chemala, Rani, dan Serbani. 2008. Derivatization of Enolic OH of Piroxicam: a Comparative Study on Esters and Sulfonates. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (3): 509-515.
- Kim H-S., Shibata Y., Ko N., Ikemoto N., Ishizuka Y., Murakami N., Sugimoto, M., Kobayashi M., Wataya Y. 2000. Potent in-vivo antimalarial activity of 3,15-di-O-acetylbruceolide against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Parasitology International* 48 :271-274.
- Phillipson J.D., Wright C.W., Kirby G.C., Warhurst D.C., 1995, Phytochemistry of some plants used in traditional medicine for the treatment of protozoal diseases, In : Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine. Ed : Hostettmann K., Marston A., Maillard M and Hamburger M. Oxford Science Publications, Oxford.
- Pouplin. J. N., and Tran. H. 2007, Antimalarial and Citotoxic Activities of Ethnopharmacologically Selected Medical Plants from South Vietnam. *J. Ethnopharm.*, 109 (2), 417-427.
- Praptiwi dan Chairul, 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Pauh Kijang (*Irvingia malayana* Oliv. ex. A. Benn) Terhadap Tingkat Penurunan Parasitemia pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Biodiversitas.* 9 (2), 96-98
- Santoso. 2011. Evaluasi Penggunaan Artesunat-Amodiakuin (Artesdiakuin) Pada Pengobatan Malaria Tanpa Komplikasi Di Puskesmas Penyandingan Dan Tanjung Lenggayap Kabupaten Oku. <http://ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/BPK/article/view/73>. Diakses tanggal 26 April 2013.
- Syamsudin, 2005. Mekanisme Kerja Obat Antimalaria. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* . 3(1) :37-40
- Tjitra E. 2000. Obat anti malaria. Dalam: Harijanto PN, penyunting. Malaria epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, dan penanganan. Jakarta: ECG, h. 195-223.
- World Health Organization . 2011. Malaria. <http://www.who.int/topics/malaria/en/>. Diakses pada 29 September 2012
- Wright, CW. 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J. Of Ethnopharmacology* 100 : 67-71.