

NILAI *INHIBITION CONCENTRATION* (IC_{50}) EKSTRAK METANOL DAUN SERNAI (*Wedelia biflora*) TERHADAP *Plasmodium falciparum* YANG DIINKUBASI SELAMA 32 dan 72 JAM

The Inhibition Concentration (IC_{50}) Rak of Methanolic Extract of Wedelia biflora on Plasmodium falciparum Incubated for 32 and 72 Hours

Rinidar¹, M. Isa¹, dan T. Armansyah¹

¹Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh
E-mail: rinidar@unsyiah.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menilai aktivitas antiplasmodium ekstrak metanol daun *Wedelia biflora* terhadap *Plasmodium falciparum* pada inkubasi 32 dan 72 jam secara *in vitro*. Kultur Plasmodium menggunakan metode *candle jar* dan uji aktivitas antiplasmodium dilakukan dengan metode mikrokultur secara *in vitro*. Aktivitas antiplasmodium dinyatakan dengan nilai *inhibition concentration* (IC_{50}) yaitu kemampuan menghambat 50% pertumbuhan Plasmodium. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC_{50} pada kultur selama 32 dan 72 jam berturut-turut sebesar 5,253 dan 276,142 $\mu\text{g/ml}$. Disimpulkan bahwa ekstrak dari daun sernai (*Wedelia biflora*) mempunyai aktivitas sebagai antiplasmodium dan daya kerjanya paling baik pada kultur 32 jam.

Kata kunci: antiplasmodium, malaria, *Plasmodium falciparum*, sernai

ABSTRACT

The aim of this research was to know the *in vitro* antiplasmodial activity of methanolic extract of leaves of *Wedelia biflora* against D-10 strains *Plasmodium falciparum* incubated for 32 and 72 hours. *Plasmodium* was cultured using *candle jar* method and antiplasmodial activity test was conducted using microculture, *in vitro*. Antiplasmodial activity was expressed by the concentration inhibiting 50% of parasite growth (IC_{50}). The result showed that the active antiplasmodial *in vitro* with an IC_{50} in culture for 32 and 72 hours were 5.253 $\mu\text{g/ml}$ and 276.142 $\mu\text{g/ml}$, respectively. In conclusion the methanolic extract of *Wedelia biflora* leaves have, highest antiplasmodial activities greater in 32 hours culture.

Key words: Antiplasmodial, malaria, *Plasmodium falciparum*, *Wedelia biflora*

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit menular yang lama dan muncul kembali, menyebar secara global, dan menimbulkan masalah baru (*re-emerging diseases*) (Ault, 1994; Clive, 2002). Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan dunia dan mempunyai dampak yang nyata pada perkembangan sosial, menurunkan produktivitas, serta ekonomi dalam masyarakat (Scach dan Malaruy, 2002).

Pemberantasan terhadap penyakit malaria semakin sulit karena ditemukannya kasus resistensi parasit terhadap obat antimalaria seperti klorokuin (CQ) dan sulfadoksin-primetamin (SP) hampir seluruh provinsi di Indonesia. Menurut lembaga molekuler Eijkman, hampir 100% parasit malaria di Indonesia telah mengalami mutasi gen dan kebal terhadap klorokuin dan antara 30-100% kebal terhadap sulfadoksin-primetamin (Tarigan, 2007). Kasus resistensi ini juga ditemukan di daerah Sabang (Baird *et al.*, 1996; Tjitra *et al.*, 1997; Harijanto, 2000; Baird, 2004). Oleh karena itu, perlu segera dilakukan langkah-langkah pengobatan baru (Harijanto, 2000).

Berkaitan dengan pengembangan obat baru, tumbuhan dapat dijadikan sebagai bahan sumber obat dikarenakan adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Senyawa ini menjadi penting karena memiliki aktivitas biologis yang berguna bagi

mahluk hidup. Dengan demikian, diharapkan senyawa metabolit sekunder ini memiliki aktivitas farmakologis yang bermanfaat dan bernilai ekonomi dengan cara melakukan penelitian ilmiah sehingga khasiat dan keamanannya dapat dipertanggungjawabkan.

Salah satu jenis tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat adalah tumbuhan sernai (*Wedelia biflora*). Tumbuhan ini berasal dari keluarga *Arteceae* yang mengandung senyawa terpenoid. Secara empiris, tumbuhan ini dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat penurun panas (antipiretik). Diduga, sifat antipiretik inilah yang bisa membantu penderita malaria dalam melawan penyakitnya (Sastrapradja *et al.*, 1986; Dzulkarnain, 2003).

Kemampuan tumbuhan sernai dalam menurunkan panas erat berkaitan dengan patogenesis penyakit malaria. Hal ini berkaitan dengan terinfeksi eritrosit manusia oleh suatu protozoa yaitu *Plasmodium* sp. Protozoa ini akan menyebabkan eritrosit pecah dan menimbulkan manifestasi demam pada penderita. Oleh karena itu perlu dikaji kemampuan ekstrak daun sernai dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium* sp.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan di dalam penelitian adalah daun sernai, parasit malaria yaitu *Plasmodium falciparum* strain D-10, dan medium untuk inkubasi.

Prosedur Penelitian

Preparasi tumbuhan untuk penelitian

Tumbuhan yang digunakan adalah daun sernai yang didapatkan dari daerah Darussalam, Banda Aceh. Sampel daun dari tumbuhan sernai yang berumur lebih dari 1 tahun dan panjang > 0,5 meter dan yang diambil adalah daun pada ketinggian 0,8 meter dari permukaan tanah. Daun tumbuhan *Wedelia biflora* yang masih segar dirajang sepanjang 0,25 cm kemudian ditimbang sebanyak 3 kg untuk dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Pelarut yang digunakan diganti setiap 24 jam sekali (Silva *et al.*, 1998). Proses maserasi dilakukan secara berulang-ulang sampai diperoleh larutan jernih. Kemudian ekstrak metanol diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak metanol daun sernai dimasukkan dalam *laminar air flow* untuk disterilkan dengan sinar ultraviolet (UV), di ambil sedikit ekstrak dimasukkan dalam tabung Falcon dan ditimbang sebanyak 12,7 mg, dilarutkan dalam dimetilsulfoksid (DMSO) sebanyak 100 µg, diaplusing lalu ditambah larutan Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sebanyak 12,600 µl di dalam *laminar air flow*. Larutan ini sebagai larutan stok. Kemudian dibuat berbagai dosis senyawa uji dengan cara mengencerkan larutan stok secara serial dengan konsentrasi pembuatan mikrokultur dan uji aktivitas antiplasmodium 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 µg/ml.

Parasit penelitian

Parasit yang digunakan adalah isolat *Plasmodium falciparum strain D 10* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan dikembangkan berdasarkan metode Trager dan Jensen (1976). Untuk uji antiplasmodium, parasit yang dipakai adalah stadium cincin. Untuk mendapatkan parasit dalam stadium ini maka dilakukan sinkronisasi dengan larutan D-sorbitol 5%.

Pembuatan media inkubasi

Media untuk pembuatan inkubasi *Plasmodium falciparum* yang digunakan adalah RPMI 1640. Media ini mengandung garam-garam, vitamin, dan asam amino untuk pertumbuhan parasit. Media dilengkapi dengan glutamin dan fenol merah sebagai pH indikator. Cara pembuatan RPMI adalah dengan menimbang sebanyak 10,4 g serbuk RPMI yang mengandung L-glutamin dan dilarutkan dalam 960 ml akuabides steril. Kemudian ditambahkan HEPES (N-2-hidroksil etil piperazin-N-etan sulfonic acid) 5,94 g dan tambahkan 50 mg gentamisin dan larutan NaHCO₃ untuk mendapatkan media tanpa serum pH 7,4 yang merupakan pH optimum pertumbuhan parasit. Selanjutnya, dilakukan sterilisasi media dengan filtrasi menggunakan filter mikro ukuran 0,22 µm. Media disimpan dalam suhu 4° C untuk menghindari kontaminasi dan kerusakan.

Penyediaan eritrosit tidak terinfeksi

Eritrosit diperlukan untuk pertumbuhan *Plasmodium falciparum* selama inkubasi. Eritrosit yang

digunakan adalah golongan O yang diambil dari darah vena. Darah donor sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tabung 15 ml yang mengandung 1 ml antikoagulan ACD dan ditambahkan media RPMI sehingga volume mencapai 10-15 ml. Kemudian tabung berisi darah disentrifus dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 15 menit pada suhu kamar. Selanjutnya supernatan yang mengandung plasma dan endapan eritrosit yang diperoleh dicuci dengan media RPMI sebanyak 2 x dengan cara sentrifus seperti pada pencucian pertama. Eritrosit golongan O yang diperoleh ditambah media dengan volume yang sama dan disimpan di lemari pendingin dan hanya dapat disimpan sampai 10 hari.

Penyiapan *Plasmodium falciparum* untuk pembiakan

Plasmodium falciparum yang tersimpan dalam ampul dari tabung nitrogen dicairkan dalam *waterbath* 37° C. Isi ampul dipindahkan ke *conical tube*, ditambahkan tetes demi tetes larutan NaCl 12% untuk tiap 1 ml larutan dalam ampul. Larutan didiamkan selama 3 menit, selanjutnya ditambahkan tetes demi tetes NaCl 1,6% dengan perbandingan 10 ml larutan NaCl 1,6% untuk tiap 1 ml larutan dalam ampul. Larutan disentrifus pada 1 ml larutan dalam ampul.

Larutan disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit, supernatannya di buang. Campuran larutan NaCl 1,9% dan dektrosa 0,2% ditambahkan dalam *conical tube* tersebut dengan perbandingan 10 ml larutan campuran untuk 1 ml larutan dalam ampul. Larutan disentrifus lagi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan media komplit dan serum manusia, masukkan ke dalam *culture flask* kemudian diinkubasi selama 48 jam dengan posisi *culture flask* tegak.

Kultur *Plasmodium falciparum* dikerjakan dengan metode *candle jar* (Trager dan Jensen, 1976). Sel darah merah yang terinfeksi parasit dibiakkan dalam *culture flask* yang mengandung 8 ml medium komplit (mengandung 10% serum), dengan hematokrit akhir 1,5%. Manipulasi kultur ini dilakukan dalam *laminar flow cabinet* dalam kondisi steril, kemudian dinkubasi di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C.

Untuk mempertahankan kultur yang dibuat, medium diganti dengan yang baru setiap 24 jam masa inkubasi. Bila parasitemia terlalu tinggi (lebih dari 10%) maka dibuat subkultur dengan menambahkan sel darah normal sehingga parasitemia menjadi rendah (kurang dari 1%) agar tidak terlalu pada bila dipakai untuk uji aktivitas antiplasmodium.

Uji aktivitas antiplasmodium

Mikrokultur menggunakan *microplate* 96 sumuran mempunyai 8 baris, A sampai H dan kolom 1 sampai dengan 12. Setiap sumuran diisi dengan 100 µl larutan ekstrak uji dan 100 µl medium komplit yang mengandung parasit dengan parasitemia 2% dan hematokrit 3%. Serial konsentrasi akhir larutan ekstraksi di *microplate* diperoleh 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 3,125 µg/ml. Setiap dosis dibuat tripikat, kontrol negatif menggunakan media RPMI.

Mikrokultur dipindahkan ke kotak desikator (*candle jar*) hampa udara dengan memakai lilin. Desikator ditutup rapat saat nyala lilin akan mati untuk mendapatkan konsentrasi gas yang optimal. Selanjutnya *microplate* beserta isinya diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C selama 32 dan 72 jam. Setelah masa inkubasi berakhir, tiap sampel dibuat sediaan apus kemudian diwarnai dengan pewarna giemsa dan dihitung parasitemianya secara visual menggunakan mikroskop.

Analisis Data

Aktivitas antiplasmodium *in vitro* dinyatakan dengan besarnya nilai IC₅₀ yang dianalisis menggunakan analisis regresi probit SPSS terhadap data persentase penghambatan oleh ekstraksi pada tiap replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji antiplasmodium dari ekstrak daun sernai (*Wedelia biflora*) pada tahap inkubasi 32 dan 72 jam, disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Berdasarkan Tabel 1 dan 2, penghambatan parasit oleh ekstrak metanol daun sernai mengalami peningkatan seiring kenaikan konsentrasi. Pada Tabel 1, semua konsentrasi ekstrak daun sernai, mampu menghambat lebih dari 50% pertumbuhan *Plasmodium falciparum* pada inkubasi 32 jam kecuali pada konsentrasi 3,125 µg/ml jam sedangkan pada konsentrasi 200 µg/ml yang mampu menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium falciparum* pada inkubasi 72 jam.

Untuk menilai hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum*, dianalisis menggunakan probit dari program SPSS 13.0 sehingga akan diketahui nilai *inhibition concentration* (IC₅₀). Hasil analisis didapatkan nilai IC₅₀ *Plasmodium falciparum* pada kultur selama 32 dan 72 jam berturut adalah 5,253 dan 276,142 µg/ml. Interpretasi nilai IC₅₀ ini, menggambarkan bahwa kemampuan konsentrasi ekstrak metanol dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* di dalam eritrosit *in vitro* sebesar 50%. Semakin kecil harga IC₅₀ maka semakin besar efektivitas penghambatan ekstrak terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum*.

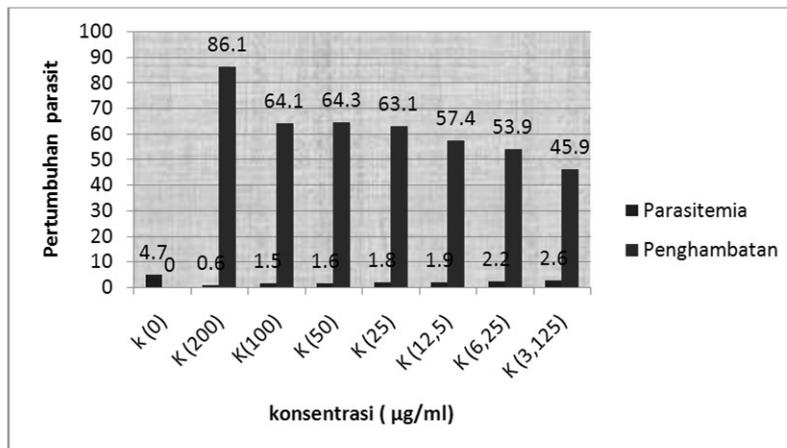
Nilai IC ini bila kita merujuk katagori Gessler (1994), yang mengatakan bahwa aktivitas antiplasmodium zat uji secara *in vitro* terbagi 3 yaitu: zat uji dengan aktivitas paling baik bila nilai IC₅₀ ≤ 10 µg/ml, aktivitas baik bila nilai IC₅₀ antara 10-50 µg/ml, dan akitivitas kurang baik bila nilai IC₅₀ ≥ 50 µg/ml. Berdasarkan analisis tersebut, memperlihatkan bahwa ekstrak metanol daun sernai (*wedelia biflora*) memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* dengan nilai IC₅₀ terkecil yaitu 5,253 µg/ml pada inkubasi 32 jam, sedangkan pada inkubasi 72 jam sebesar 276,142 µg/ml. Dengan demikian berdasarkan kategori tersebut maka ekstrak metanol daun sernai mampu menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium falciparum* pada inkubasi 32 jam dengan konsentrasi ekstrak sebesar 5,253 µg/ml.

Tabel 1. Persentase parasitemia dan penghambatan rata-rata *Plasmodium falciparum* Strain D10 setelah diberi ekstrak metanol daun sernai *in vitro* 32 jam

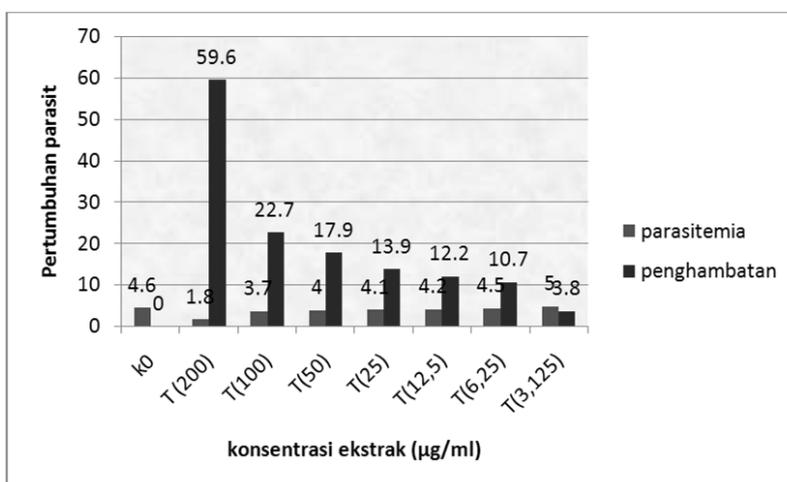
Konsentrasi ekstrak metanol daun Sernai (µg/ml)	Parasitemia (%)	Penghambatan (%)
Kontrol	4,737 ± 0,908	
200	0,637 ± 0,065	86,15 ± 3,360
100	1,570 ± 1,222	64,392 ± 15,771
50	1,610 ± 0,471	64,304 ± 14,697
25	1,880 ± 0,979	63,174 ± 29,508
12,5	1,914 ± 0,496	57,43 ± 16,844
6,25	2,251 ± ,040	53,938 ± 12,803
3,125	2,667 ± 1,171	45,965 ± 17,747

Tabel 2. Persentase parasitemia dan penghambatan rata-rata *Plasmodium falciparum* strain D10 setelah diberi ekstrak metanol daun sernai *in vitro* 72 jam

Konsentrasi ekstrak metanol daun sernai (µg/ml)	Parasitemia (%)	Penghambatan (%)
Kontrol	4,649 ± 0,757	
200	1,816 ± 0,575	59,569 ±17,547
100	3,784± 1,439	22,738 ±12,253
50	4,084± 0,495	17,976±23,765
25	4,118± 1,373	13,986 ±31,135
12,5	4,216± 1,22	12,224 ±11,786
6,25	4,580± 1,267	10,714±11,041
3,125	5,0426 ±0 ,74	3,848 ±6,664



Gambar 1. Penghambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* inkubasi 32 jam pada berbagai konsentrasi



Gambar 2. Penghambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* inkubasi 32 jam pada berbagai konsentrasi

Bila dirujuk pada siklus hidup *Plasmodium falciparum*, maka terlihat bahwa ekstrak daun sernai mempunyai aktivitas antiplasmodium cenderung pada tahap trophozoit. Hal ini disebabkan siklus hidup *Plasmodium falciparum* pada waktu 24-36 jam berada pada zona trophozoit (Steicland, 1991; Ghorri dan Haldar, 1995). Aktivitas antiplasmodium ini kemungkinan disebabkan adanya senyawa aktif terpenoid yang diduga mencegah terjadinya pembelahan inti trophozoit menjadi skizon. Namun demikian, kemampuan ekstrak metanol daun sernai ini bekerja pada tahap trophozoit masih memerlukan data pendukung lain, karena aktivitas ini baru diketahui secara *in vitro*. Untuk melihat kemampuan aktivitasnya diperlukan tahapan lanjut berupa uji *in vivo* ketika sistem metabolisme obat di dalam tubuh akan sangat mempengaruhi zat aktif di dalam ekstrak metanol daun sernai. Untuk itu perlu diteliti kembali, mengingat hasil penelitian ini merupakan data awal khasiat tumbuhan sernai ini sebagai antiplasmodium.

KESIMPULAN

Ekstrak dari daun sernai mempunyai aktivitas sebagai antiplasmodium dan daya kerja paling baik diperoleh pada kultur 32 jam dengan IC₅₀ sebesar 5,253 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

Ault, S.K. 1994. Environmental Management: A Re-emerging Disease Control strategy. Environmental Health Consultants International., **Am. J. Trop.Med.Hyg.** 50(6 suppl).

Baird, J.K. 2004. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicroba Agents Chemother.** 4811:4075-4083.

Baird, J.K., Sustriayu, M.F. Nalim, H. Basri, S. Masbar, B. Leksana, E. Tjitra, R.M. Dewi, Hairani, and F.S. Wignal. 1996. Survey of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Indonesia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 90:409-411.

Clive, S. 2002. Integrated Approach to malaria control. **Clinical Microbiology Reviews.** 159(2):65-69.

Dzulkarnain. 2004. **Tanaman Obat Malaria**. Puslitbang Farmasi, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.

Gessler, M.C., M.H.N. Nkunya, L.B. Mwasumbi, M. Heinrich, and M. Toner.1994. Screening tanzanian medical plants for antimalarial activity. **Acta.Trop.**56:65-77.

Ghorri, N. and K. Haldar.1995. Spingolipid synthesis as a target for chemotherapy againts malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 82:9181-9185.

Harijanto, P.N. 2000. **Malaria: Epidemiologi, Manifestasi Klinis dan Penanganan**. EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.

Silva, G., Ik-Soo Lee, and D.A. Kinghorn 1998. **Special Problems with the Extraction of Plants: Methods in Biotechnology**. Natural Products Isolation. Edited by Cannell, R.K. Humana Press Inc, Totowa,NJ.

Sachs, J. and P. Malaney. 2002. The economic and social burden of malaria. **Nature** 415(7):680-685

Sastrapradja, S. Nagai, dan Y. Naito. 1986. **Indeks Tumbuhan Obat di Indonesia**. PT.Eisai, Indonesia.

- Steicland, G.T. 1991. **Infections of the Blood and Reticuloendothelial System**. G.T. Strickland (Eds). Hunter's Tropical Medicine 7th. W.B.Saunders Company, Philadelphia.
- Tarigan, J. 2007. **Kombinasi Kina Tetrasiklin pada Pengobatan malaria Falciparum tanpa komplikasi di daerah resisten multidrug malaria**. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Tjitra, E., S. Gunawan, F.H.M. Laihad, S. Sulaksono, S.L. Arjoso, and N. Manurung. 1997. Evaluation of antimalarial drugs in Indonesia 1981-1995. **Buletin Penelitian Kesehatan** 25:27-58.
- Trager, W. and J.B. Jensen. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. **Science** 193:673-675.