

AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEM DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN MANURAN *Coptosapelta tomentosa* Valeton ex K. Heyne (Rubiaceae)

Arnida^{1*}, Sutomo¹, Lia Rusyida¹

¹Program Studi Farmasi Fakultas MIPA, Universitas Lambung Mangkurat

*arnida01@ulm.ac.id

Submission Date: 28-09-2018; Review Completed: 29-12-2018; Accepted Date: 06-01-2019

ABSTRACT

Malaria is a serious disease caused by Plasmodium parasites and is transmitted by the salivary glands of female Anopheles mosquito. The manuran (Coptosapelta tomentosa Valeton ex K. Heyne) is empirically used as a malarial treatment. The study aimed to determine the IC₅₀ value of ethyl acetate fraction and the compounds contained on the C. tomentosa Valeton ex K. Heyne leaf ethyl acetate fraction. The identification of chemical composition used tube test method. The inhibitory activity of heme polymerization in vitro did by Basillico modified method. The identification of chemical contents on the ethyl acetate fraction of C. tomentosa leaf Valeton ex K. Heyne showed positive results containing flavonoid, tannin, saponin, terpenoid, and anthraquinone. The average percentage heme polymerization inhibition of C. tomentosa valeton ex K. Heyne leaf ethyl acetate fraction respectively from large to small concentrations of 97.94; 96.94; 95.01; 91.63; 86.19; 76.12; and 44.83 %. Result of probit analysis, that it has HPIA IC₅₀ value of 0.252±0.009 mg/mL and chloroquine diphosphate was 0.214±0.012 mg/mL. The independent sample T-test showed that there was significant difference between IC₅₀ value of them. The ethyl acetate fraction of C. tomentosa leaf Valeton ex K. Heyne has heme polymerization inhibition activity.

Keywords: heme polymerization, *Coptosapelta tomentosa* Valeton ex K. Heyne, Rubiaceae, Antimalarial

I. PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang sangat berbahaya yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* dan ditularkan oleh air liur nyamuk *Anopheles* betina (WHO, 2010). Penyakit ini banyak ditemukan di daerah iklim tropis salah satunya seperti di Indonesia (Wahyono *et al.*, 2010). Penyakit malaria ini dapat menyebabkan kekurangan sel darah merah (anemia) dan berkurangnya jumlah kandungan hemoglobin (Hb) di dalam darah. Data yang ada di Kabupaten Banjar mengalami peningkatan dari 275 orang pada tahun 2011 menjadi 335 orang di tahun 2012 (Dinkes Kab Banjar, 2012).

Manuran, *Coptosapelta tomentosa* Valeton ex K. Heyne adalah salah satu tanaman dari daerah Kotabaru Kalimantan Selatan yang digunakan secara empiris oleh masyarakat sebagai antimalaria. Ekstrak etanol daun *C. tomentosa* mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, antrakuinon, terpenoid, dan glikosida. Penelitian Shafwatunnida (2009) tentang kandungan senyawa pada fraksi etil asetat dari akar *C. tomentosa* meliputi flavonoid, tanin, saponin, antrakuinon, dan terpenoid. Belum adanya penelitian mengenai khasiat fraksi etil asetat

daun *C. tomentosa* asal Kotabaru Kalimantan Selatan sebagai antimalaria, sehingga peneliti ingin melakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas penghambatan polimerisasi hem fraksi etil asetat daun *C. tomentosa* asal Kotabaru Kalimantan Selatan.

Penelitian ini dilakukan dengan metode penghambatan polimerisasi hem. Polimerisasi hem merupakan metode yang sederhana dan cukup akurat untuk mengetahui adanya aktivitas antimalaria. Polimerisasi hem juga digunakan sebagai skrining awal untuk mempelajari mekanisme kerja senyawa tanaman yang mengandung khasiat sebagai antimalaria (Huy *et al.*, 2007).

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah alat gelas (Pyrex® Iwaki Glass) batang pengaduk, cawan penguap, chamber, maserator, mikrotube, pipet tetes, pipet volume, pisau, pro pipet, rak tabung, *rotary evaporator* (Heidolph), microplate 96 sumuran (Matrix®), mikropipet (Effendorf), UV 254, UV 366, pH meter, timbangan analitik, sentrifuge, inkubator

(Memmert), vortex mixer (Maxi Mix II®), waterbath (Memmert) dan ELISA reader (EON™).

Bahan yang digunakan adalah daun *C. tomentosa*, aluminium foil, anisaldehyd asam sulfat (teknis), ammonia (p.a), akuades, asam asetat anhidrat (teknis), asam asetat glasial (p.a), asam sulfat pekat (teknis), benzena, besi (III) klorida, DMSO 100% (p.a), etil asetat (teknis), n-heksana (teknis), FeCl₃ 1%, H₂SO₄, HCl 2 N, kalium hidroksida etanolik, kertas saring, kloroform (teknis), klorokuin difosfat, kristal hematin, methanol (p.a), NaOH, etanol 96%, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, dan silika GF₂₅₄.

B. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Daun *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne

Sebanyak 193,73 gram serbuk kasar daun *C. tomentosa* direndam dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 4 L. Maserasi dilakukan 1x24 jam. Larutan selanjutnya disaring dan residu diremaserasi sebanyak 4 kali. Hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental.

2. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne

Ekstrak etanol kental yang diperoleh disuspensikan menggunakan akuades dengan perbandingan ekstrak dan akuades 1:4. Sampel sebanyak 10 gram disuspensikan dengan 40 mL akuades sampai homogen dan dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan n-heksana sebanyak 40 mL, dihomogenkan dan difraksinasi dengan cara di gojok, dan didiamkan sampai terjadi pemisahan 2 lapisan. Lapisan n-heksana dipisahkan dan lapisan air yang tertinggal ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 40 mL, dihomogenkan dan difraksinasi dalam corong pisah dengan cara digojok. Fraksinasi ini dilakukan 9x replikasi hingga pelarut n-heksana jernih, selanjutnya fraksi air di fraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat dengan menggunakan cara yang sama seperti di atas, dilakukan 3x replikasi, Lapisan etil asetat yang terdapat pada bagian atas diambil, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* hingga didapat ekstrak kental.

3. Skrining Fitokimia

a. Alkaloid

Sebanyak 2 mg fraksi etil asetat dilarutkan dengan 5 mL HCL 2 N. Larutan dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung pertama dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung

kedua menunjukkan adanya alkaloid (Jones & Kinghorn, 2006).

b. Flavonoid

Sebanyak 2 mL fraksi etil asetat ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl₃, apabila terbentuk warna ungu maka positif mengandung flavonoid (Atun, 2014).

c. Steroid

Larutan fraksi etil asetat sebanyak 0,5 mL ditambah dengan 2 mL pereaksi Lieberman Burchard. Hasil positif adanya steroid ditandai dengan perubahan warna dari violet menjadi biru atau hijau (Handayani, 2010).

d. Terpenoid

Sebanyak 0,10 mg fraksi etil asetat dilarutkan dengan kloroform kemudian disaring, ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat, lalu dikocok. Jika campuran berbentuk endapan cincin coklat hasil positif triterpen (Tiwari *et al.*, 2011).

e. Tanin

Sebanyak 3 mL larutan fraksi etil asetat ditambahkan 5 tetes NaCl 10%, dan 3 tetes pereaksi FeCl₃. Terbentuknya campuran berwarna biru tua atau hijau kehitaman (Marliana, 2005).

f. Saponin

Sebanyak 0,5 g fraksi etil asetat ditambahkan 5 mL akuades. Larutan dikocok kemudian terbentuknya buih yang stabil selama 30 menit maka dapat dinyatakan senyawa positif mengandung saponin (Atun, 2014).

g. Antrakuinon

Sebanyak 1 mL larutan fraksi etil asetat ditambahkan dengan 2 mL ammonia. Jika terbentuk warna merah maka senyawa tersebut mengandung antrakuinon dan kuning untuk antron dan diantron (Setyawaty *et al.*, 2014).

4. Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam yang digunakan adalah plat silika GF₂₅₄. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm sedangkan fase gerak dan penampakan noda yang digunakan adalah sebagai berikut:

a. Alkaloid

Fase gerak n-heksana (p.a) – etil asetat (p.a) (7:3). Hasil positif apabila timbul bercak warna coklat atau jingga pada hasil kromatografi setelah disemprot dengan Dragendorff. Penampakan bercak tanpa pereaksi kimia di bawah lampu UV 366 nm alkaloid akan berfluoresensi biru, biru hijau, atau ungu (Marliana, 2007).

b. Flavonoid

Fase gerak n-heksana (p.a) – etil asetat (p.a) (7:3). Penampakan noda berupa uap ammonia yang menimbulkan warna kuning muda pada hasil kromatografi menunjukkan adanya flavonoid (Marliana, 2007).

c. Steroid dan Terpenoid

Fase gerak n-heksana (p.a) – etil asetat (p.a) (7:3). Penampakan bercak yang digunakan adalah pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat. Hasil positif apabila timbul bercak warna ungu-merah atau ungu pada hasil kromatografi (Wagner & Bland, 1996).

d. Tanin

Fase gerak n-heksana (p.a) – etil asetat (p.a) (7:3). Jika timbul warna ungu kehitam pada hasil kromatografi setelah penyempnotan pereaksi FeCl_3 10% menunjukkan adanya senyawa tanin (Hayati *et al.*, 2012).

e. Antrakuinon

Fase gerak n-heksana (p.a) – etil asetat (p.a) (7:3). Pereaksi semprot kalium hidroksida etanolik. Hasil dikatakan positif apabila memberikan warna violet merah pada hasil kromatografi (Wagner & Bland, 1996).

5. Uji Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem

Kelompok bahan uji dan kontrola ositif (klorokuin difosfat) masing-masing dibuat seri konsentrasi 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; dan 0,3125 mg/mL. Diambil masing-masing 100 μL dimasukkan ke dalam mikrotube. Penambahan 200 μL larutan hematin ke dalam masing masing seri konsentrasi, selanjutnya ditambahkan 100 μL larutan asam asetat glasial 100 % (pH 2,6). Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, tiap-tiap uji dalam mikrotube disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan dan supernatant dipisahkan, supernatant dibuang. Endapan dicuci dengan menambahkan 400 μL DMSO 100%, disentrifuse berkecepatan 8000 rpm selama 10 menit, setelah itu dibuang supernatant dibuang, lalu ditambahkan lagi dengan 400 μL DMSO 100%. Pencucian diulangi sebanyak 3 kali. Endapan yang diperoleh ditambahkan NaOH 0,1 M sebanyak 400 μL , kemudian diambil sebanyak 100 μL dimasukkan

ke dalam microplate 96 sumuran dan dibaca nilai absorbansinya pada Elisa reader.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi maserasi sebanyak 12,35 gram, sehingga diperoleh persen rendemen sebesar 6,37%. Dari 10 gram ekstrak etanol yang difraksinasi dengan cara corong pisah diperoleh fraksi etilasetat sebesar 0,817 gram sehingga diperoleh persen rendemen 8,17%.

Skrining Fitokimia

Golongan senyawa yang positif dari hasil skrining fitokimia yaitu golongan flavonoid, tanin, saponin, steroid, terpenoid, dan antrakuinon (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat daun *C. tomentosa*

No	Golongan senyawa	Jenis pereaksi	Hasil
1	Alkaloid	Dragendorff Mayer	- -
2	Flavonoid	FeCl_3	+
3	Tanin	FeCl_3	+
4	Saponin	Tes buih	+
5	Steroid	Lieberman Burchard	- -
6	Terpenoid	Salkowski's Test	+
7	Antrakuinon	Ammonia	+

Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mempertegas hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan (Tabel 1). Hasil identifikasi dengan KLT diperoleh senyawa yang bereaksi positif adalah flavonoid, terpenoid dan steroid, tanin, antrakuinon, dan saponin (Tabel 2).

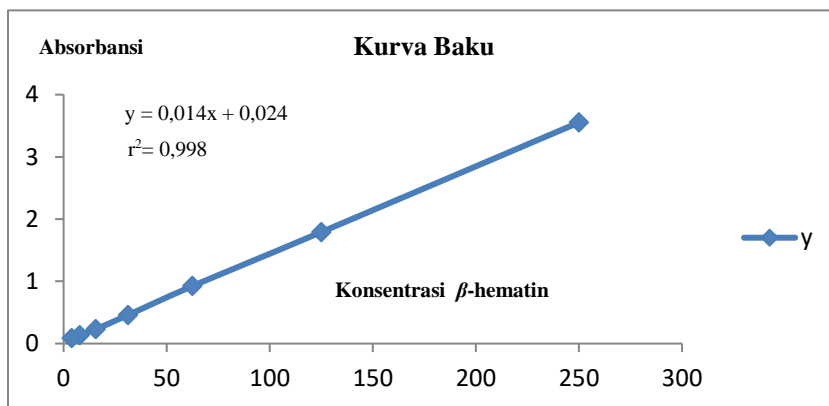
Tabel 2. Hasil kromatogram fraksi etil asetat daun *C. tomentosa* setelah disempnot dengan pereaksi.

No.	Senyawa	Pereaksi Semprot	Warna Bercak	Kesimpulan
1	Alkaloid	Dragendorff	-	(-)
2	Flavonoid	Uap ammonia	Biru terang	(+)
3	Terpenoid dan Steroid	Anisaldehyd asam Sulfat	Merah	(+)
4	Tanin	FeCl_3	Hitam-hijau	(+)
5	Antrakuinon	KOH-etanolik	Violet-Merah	(+)
6	Saponin	Anisaldehyd as. sulfat	Violet	(+)

Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Fraksi Etil Asetat Daun *C. tomentosa* Valetton Ex. K. Heyne

Pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi hem diawali dengan penentuan kurva baku hematin, dengan cara pembacaan absorbansi pada *ELISA reader* dengan Panjang gelombang 405

nm (Basilico *et al.*, 1998). Hasil kurva baku yang diperoleh menunjukkan persamaan linear $y = 0,014x + 0,024$ dengan nilai koefisien kolerasi (r) = 0,999 dan nilai $r^2 = 0,998$ (Gambar 1). Nilai koefisien kolerasi menunjukkan bahwa adanya hubungan linear yang terjadi antara konsentrasi dan absorbansi sebesar 99,9%.



Gambar 1. Kurva baku hematin

Persamaan kurva baku $y = 0,014x + 0,024$ digunakan untuk menentukan kadar *beta*-hematin masing-masing konsentrasi. Penetapan kadar β -hematin ditentukan dengan cara memasukkan nilai absorbansi sampel uji sebagai nilai 'y' pada persamaan $y = 0,014x + 0,024$. Kadar *beta*-hematin

yang diperoleh adalah nilai 'x' pada persamaan (Tabel 3). Persen penghambatan akan diperoleh dari nilai kadar *beta*-hematin yang diperoleh. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka semakin tinggi nilai persen penghambatannya (Tabel 3).

Tabel 3. Pengaruh pemberian fraksi etil asetat daun *C. tomentosa* Valetton ex K. Heyne terhadap aktivitas penghambatan polimerisasi hem

No	Bahan Uji	Konsentrasi (mg/mL)	Rerata Kadar Hemozoin \pm SD	Rerata % Penghambatan \pm SD	IC ₅₀ (mg/mL)
1	Fraksi etil asetat daun <i>C. tomentosa</i>	20	2,67 \pm 0,27	97,94 \pm 0,21	0,252 \pm 0,009
		10	3,95 \pm 0,29	96,94 \pm 0,22	
		5	6,45 \pm 0,48	95,01 \pm 0,37	
		2,5	10,81 \pm 0,62	91,63 \pm 0,48	
		1,25	17,83 \pm 0,46	86,19 \pm 0,36	
		0,625	30,86 \pm 0,31	76,12 \pm 0,42	
		0,3125	71,29 \pm 1,18	44,83 \pm 0,91	
2	Kontrol positif Klorokuin difosfat	20	2,31 \pm 0,11	98,17 \pm 0,09	0,214 \pm 0,012
		10	3,48 \pm 0,15	97,25 \pm 0,12	
		5	5,67 \pm 0,23	95,51 \pm 0,18	
		2,5	9,62 \pm 0,33	92,38 \pm 0,26	
		1,25	15,74 \pm 0,92	87,53 \pm 0,73	
		0,625	27,02 \pm 0,72	78,59 \pm 0,57	
		0,3125	64,45 \pm 1,94	48,93 \pm 1,54	

Nilai IC_{50} didapatkan melalui analisis probit. Hasil penelitian pada fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem dengan nilai IC_{50} $0,252 \pm 0,009$ mg/mL, sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Nilai IC_{50} klorokuin difosfat pada penelitian ini sebesar $0,214 \pm 0,012$ mg/mL.

Analisis hasil pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi hem ini dilakukan dengan uji *independent* sampel T-test yang digunakan untuk mengetahui signifikansi nilai IC_{50} antara fraksi etilasetat dengan klorokuin difosfat. Hasil uji menunjukkan terdistribusi normal karena tidak ada perbedaan antara bahan uji dengan klorokuin difosfat karena nilai signifikansi $> 0,05$ yaitu secara berturut-turut 0,600 dan 0,312. Homogenitas data dapat diketahui melalui uji homogenitas varians. Hasil uji tersebut menunjukkan nilai signifikansi 0,013 yang berarti $< 0,05$ sehingga H_0 ditolak. H_0 ditolak yang artinya menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna atau signifikan nilai IC_{50} fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* dengan klorokuin difosfat. Aktivitas penghambatan polimerisasi hem antara fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* dengan klorokuin difosfat dapat dikatakan tidak sebanding, karena klorokuin difosfat memiliki aktivitas yang lebih besar dalam menghambat polimerisasi hem dibandingkan fraksi etilasetat daun *C. tomentosa*.

IV. KESIMPULAN

1. Identifikasi kandungan kimia pada fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* menunjukkan hasil yang positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, dan antrakuinon.
2. Persentase penghambatan polimerisasi hem fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* pada konsentrasi 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/mL secara berturut-turut yaitu 97,94; 96,94; 95,01; 91,63; 86,19; 76,12; dan 44,83 %
3. Fraksi etilasetat daun *C. tomentosa* memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem dengan nilai IC_{50} sebesar $0,252 \pm 0,009$ mg/mL.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan pembiayaan kepada Kementerian Ristek-Dikti melalui hibah PPT. Terima kasih kepada Ibu Nurlily, M.Sc (Pharm)., Apt dan Bapak Nashrul Wathan, M. Farm., Apt atas sumbangsih saran-saran dalam perbaikan tulisan. Terima kasih dukungan tim di laboratorium Silfi, Usna, dan Humairah.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnida, Eka Rahmawaty Sahi, Sutomo, 2017, Aktivitas Antiplasmodium In Vitro Dan Identifikasi Golongan Senyawa Dari Ekstrak Etanol Batang Manuran (*Coptosapelta tomentosa* Valetton Ex K.Heyne) Asal Kalimantan Selatan, Jurnal Ilmiah Ibnu Sina, 2 (2), 270-278 .
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur. 8: 53-61.
- Basilico, N., E. Pagani, D. Monti, P. Oliaro, & 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.
- Dinkes Kabupaten Banjar. 2012. Laporan Tahunan Bidang Keluarga Tahun 2012. Seksi KIA. Kabupaten Banjar.
- Huy, N.T., Maeda, A., Uyen, D.T., Trang, D.T.X., Sasai, M., Shiono, T., Oida, T., Harada, S. & Kamei, K., 2007, Alcohols induce beta-hematin formation via the dissociation of aggregated hem and reduction in interfacial tension of the solution. Acta Tropica. 101:130–138.
- Jones, W.P., Kinghorn, A.D. (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sharker, S.D. Latif Z., Gray A.L, eds. Natural Product Isolation. 2nd edition. New Jersey, Humana Press.
- Marliana, S.D., V. Suryanti & Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. Jurusan Biologi FMIPA UNS, Surakarta.
- Setyawaty, R., A. Ismunandar, & N.Q. Ngaeni. 2014. Identifikasi Senyawa Antrakuinon Pada Batang Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Prosiding Seminar Nasional Hasil – Hasil Penelitian dan Pengabdian LPPM UMP, Purwokerto.
- Shafwatunnida, L. 2009. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Kimia Fraksi Etil Asetat Akar Tumbuhan Manuran (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K. Heyne) Asala Kabupaten Kotabaru Kalimantan Selatan. Skripsi, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.
- Tiwari, Prashant., Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur, Harleen Kaur. 2011.

- Phytochemical Screening and Extraction: A Review. International Pharmaceutica Scientia. 1: 98-106
- Wagner, H. & S. Bland. 1996. Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd Edition. Springer. Berlin Heidelberg:
- Wahyono, Pudjono & P. Widyati. 2010. Uji Aktivitas Senyawa Anti Plasmodium dari Fungi Endofit Tanaman Artemisiaannua L. Majalah Farmasi Indonesia. 21: 230-235.
- WHO. 2010. World Malaria Report. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Switzerland.