

Aktivitas antiplasmodium dari dua fraksi ekstrak n-heksana kulit batang asam kandis (*Garcinia parvifolia* Miq)

Antiplasmodial activity of two fractions obtained from n-hexane extract of *Garcinia parvifolia* Miq stem bark

Syamsudin ^{1*)}, Soesanto Tjokrosonto ²⁾, Subagus Wahyuono ³⁾ dan Mustofa ⁴⁾

¹⁾ Bagian Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta

²⁾ Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³⁾ Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴⁾ Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Abstrak

Telah dilakukan evaluasi aktivitas antiplasmodium dari fraksi A dan B yang difraksinasi dari ekstrak n-heksana kulit batang asam kandis (*Garcinia parvifolia*). Uji aktivitas antiplasmodium dilakukan menggunakan dua strain *Plasmodium falciparum* yaitu FCR-3 (galur yang resisten terhadap klorokuin) dan D10 (galur yang sensitif terhadap klorokuin), aktivitas antiplasmodium dilihat dari nilai IC₅₀ (konsentrasi 50 % yang dapat menghambat pertumbuhan parasit). Hasil penelitian menunjukkan fraksi A dan B aktif terhadap *P. falciparum* dengan nilai IC₅₀ 2,79 ± 0,10 µg/mL dan 12,30 ± 1,21 µg/mL pada galur FCR-3 dan 1,52 ± 0,24 µg/mL dan 4,66 ± 1,24 µg/mL pada galur D10. Identifikasi dari komponen aktif menunjukkan kedua fraksi mengandung triterpenoid, steroid dan flavonoid.

Kata kunci: aktivitas antiplasmodium, *Garcinia parvifolia*, komponen aktif.

Abstract

Antiplasmodial activity of fractions A and B obtained from n-hexane extract of stem bark of *Garcinia parvifolia* have been evaluated. The in vitro antiplasmodial activity was investigated on two strains of *Plasmodium falciparum*, FCR-3 a chloroquine resistant and D10, a chloroquine sensitive strains and their antiplasmodial activity was expressed by the concentration inhibiting 50 % of the parasite growth (IC₅₀). The results showed that the fractions A and B were active against *P. falciparum* with the IC₅₀ values of 2,79 ± 0,10 µg/mL and 12,30 ± 1,21 µg/mL on FCR-3 strain and 1,52 ± 0,24 µg/mL and 4,66 ± 1,24 µg/mL on D10 strain. Identification of active constituents in the both fractions showed the existence of triterpenoide, steroide and flavonoide compounds.

Key words: Antiplasmodial activity, *Garcinia parvifolia*, active constituents.

Pendahuluan

Malaria masih merupakan masalah kesehatan utama di dunia baik di negara-negara berkembang maupun maju. Menurut Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization* = WHO) sekitar 41 % penduduk dunia atau kurang lebih 2,3 milyar penduduk tinggal di daerah endemis yang berisiko terinfeksi malaria. Sebanyak 300-500 juta diantaranya terinfeksi

malaria setiap tahunnya, dan diperkirakan 1,5 – 2,7 juta meninggal per tahun terutama balita dan ibu hamil (WHO, 1997). Kondisi malaria di Indonesia tidak jauh berbeda dengan kondisi malaria di dunia. Selama tahun 1998-2001 kejadian luar biasa malaria terjadi di 11 propinsi meliputi 13 kabupaten di 93 desa dengan jumlah penderita hampir 20.000 orang dengan 74 kematian (Anonim, 2001).

Diantara faktor utama penyebab kegagalan dalam pemberantasan malaria adalah timbulnya vektor malaria, yakni nyamuk *Anopheles* yang resisten terhadap insektisida dan parasit malaria yakni *Plasmodium* yang resisten terhadap antimalaria yang tersedia. Masalah resistensi terhadap *Plasmodium* utamanya *Plasmodium falciparum* telah menjadi masalah yang serius dan mengawatirkan dewasa ini, karena mengakibatkan terjadinya kegagalan dalam pengobatan hingga timbulnya kematian. Hal ini telah mendorong para peneliti untuk berusaha menemukan antimalaria baru untuk menggantikan antimalaria yang sudah tidak sensitif lagi. Salah satu usaha untuk menemukan antimalaria baru tersebut adalah melalui eksplorasi senyawa aktif dari bahan obat alam utamanya tanaman obat yang secara tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati malaria di berbagai daerah endemik di dunia.

Genus *Garcinia sp.*, telah digunakan secara empiris untuk mengobati malaria di berbagai daerah endemik di Indonesia. Penelitian terhadap kandungan aktif *G. parvifolia* yang berasal dari Sabah (Malaysia) menunjukkan bahwa tanaman ini mengandung turunan santon dan biflavonoid. Dari kulit batang *G. parvifolia* telah berhasil diisolasi sembilan senyawa xanton baru yaitu golongan parvisanton (Xu *et al.*, 2001). Pada penelitian pendahuluan menunjukkan ekstrak n-heksana paling kuat aktivitas antiplasmodiumnya dibanding dengan ekstrak etilasetat dan ekstrak n-butanol dengan nilai IC_{50} 4.11 $\mu\text{g/mL}$ (Syamsudin *et al.*, 2007). Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji fraksi aktif ekstrak n-heksana kulit batang *G. parvifolia* Miq.

Metodologi

Bahan

Kulit batang *G. parvifolia* Miq dikumpulkan dari daerah Nang Kalis Kabupaten Kapuas Hulu, Kalimantan Barat pada bulan Maret 2004 dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense Botani, Puslitbang LIPI Bogor. Metanol, n-heksana, aseton untuk keperluan fraksinasi. Media RPMI, bufer fosfat salin, gentamisin, eritrosit manusia, serum manusia, pewarna Giemsa, dan dimetil sulfoksida (DMSO) untuk uji antiplasmodium. Dua strain *P. falciparum*, yaitu strain resisten klorokuin FCR-3 dan

sensitif klorokuin D10 yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi FK-UGM, Yogyakarta.

Alat

Vakum evaporator, gelas piala, alat-alat gelas lazim, seperangkat mikropipet, alat KLT, Lampu UV, *Laminar Air Flow* (LAF), sumuran, inkubator CO_2 , mikroskop, dan gelas objek.

Jalannya penelitian

Preparasi ekstrak n-heksana

Ekstrak n-heksana yang diperoleh dari maserasi 400 g serbuk kulit batang *G. parvifolia* Miq dengan pelarut n-heksana sebanyak 1,5 L menghasilkan ekstrak n-heksana kental, kemudian diuapkan dengan menggunakan *vacuum evaporator* dan dikeringkan sehingga dihasilkan ekstrak dengan bobot tetap sebanyak 3,52 g. Ekstrak n-heksana yang dihasilkan dipartisi dengan metanol (3000 rpm, 20°C) memberikan sari yang larut dalam metanol (Fraksi A) dan sari tidak larut dalam metanol (Fraksi B). Dari hasil fraksinasi dilakukan KLT dengan cairan eluasi n-heksana-aseton (7:3) Selanjutnya, kedua fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas antiplasmodium.

Uji aktivitas antiplasmodium

Uji aktivitas antiplasmodium pada fraksi A dan B menggunakan kultur *Plasmodium falciparum* strain FCR-3 dan D10 yang telah dibiakkan secara sinambung dengan teknik modifikasi dari Trager dan Jensen (1976). Uji antiplasmodium dilakukan tiga kali dengan tiga kali replikasi memakai lempeng sumur mikro 96 lubang. Setiap sumur berisi 100 μL medium lengkap dengan eritrosit 5% dan parasitemia 3%. Sediaan uji dengan konsentrasi 20, 16, 12, 8, 4, 2 $\mu\text{g/mL}$ dimasukkan 100 μL pada setiap lempeng sumur. Setelah diinkubasi selama 24 dan 72 jam, hasil dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tipis yang dicat dengan pewarna Giemsa. Selanjutnya dihitung persen penghambatan pertumbuhan dari *P. falciparum* dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi terhadap 2000 eritrosit oleh tiga orang secara *independent*.

Identifikasi kandungan kimia

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kimia di dalam fraksi digunakan KLT dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak n-heksana:aseton (7:3). Deteksi menggunakan sinar ultra violet 254 dan 366 dengan pereaksi asam sulfat 10% dalam metanol, uap amoniak, dan pereaksi Lieberman - Burchard.

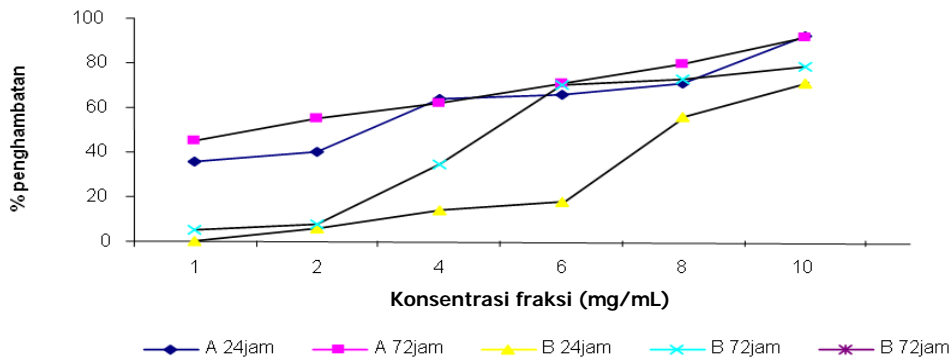
Analisis data

Aktivitas antiplasmodium digambarkan dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) yang ditetapkan dengan analisis probit berdasarkan kurva hubungan antara probit persen penghambatan dengan logaritma kadar (Finney, 1964).

Hasil Dan Pembahasan

Hasil pengamatan ditampilkan berupa grafik antara konsentrasi fraksi terhadap % penghambatan pertumbuhan (Gambar 1 dan 2).

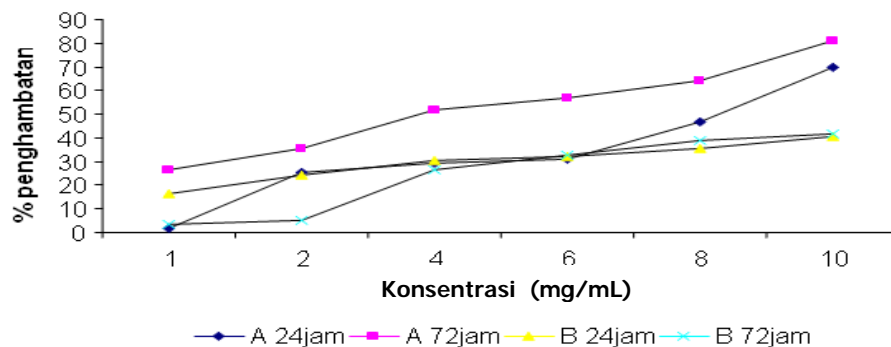
Gambar 1 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi fraksi maka % hambatan parasitemia semakin besar. Pada konsentrasi terkecil (1 $\mu\text{g/mL}$) fraksi A baik pada masa inkubasi 24 jam atau 72 jam secara berturut-turut sebesar $35,4 \pm 1,3\%$, $45,4 \pm 1,4\%$ dan fraksi B secara berturut-turut sebesar $0,15 \pm 0,1\%$, $4,7 \pm 0,9\%$. Pada konsentrasi 10 kalinya (10 $\mu\text{g/mL}$) mampu menghambat pertumbuhan parasit berturut-turut sebesar $91,7 \pm$



Gambar 1. Rerata persen penghambatan (% \pm SD) pertumbuhan *P. falciparum* strain resisten klorokuin (FCR-3) setelah pemberian fraksi A dan B dengan masa inkubasi 24 dan 72 jam.

Keterangan :

A 24 : fraksi A yang diinkubasi selama 24 jam, A 72 : fraksi A yang diinkubasi selama 72 jam
 B 24 : fraksi B yang diinkubasi selama 24 jam, B 72 : fraksi B yang diinkubasi selama 72 jam



Gambar 2. Rerata persen penghambatan (% \pm SD) pertumbuhan *P. falciparum* strain sensitif klorokuin (D10) setelah pemberian fraksi A dan B dengan masa inkubasi 24 dan 72 jam.

Keterangan :

A 24 : fraksi A yang diinkubasi selama 24 jam, A 72 : fraksi A yang diinkubasi selama 72 jam
 B 24 : fraksi B yang diinkubasi selama 24 jam, B 72 : fraksi B yang diinkubasi selama 72 jam

1,7 %, $91,4 \pm 1,3\%$ dan fraksi B secara berturut-turut sebesar $70,4 \pm 1,3\%$, $78,3 \pm 1,4\%$.

Gambar 2 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi fraksi maka % hambatan parasitemia semakin besar. Pada konsentrasi terkecil ($1 \mu\text{g/mL}$) fraksi A baik pada masa inkubasi 24 jam atau 72 jam secara berturut-turut sebesar $17,3 \pm 1,3\%$, $26,5 \pm 1,3\%$ dan fraksi B secara berturut-turut sebesar $16,3 \pm 1,4\%$, $3,2 \pm 1,1\%$. Pada konsentrasi 10 kalinya ($10 \mu\text{g/mL}$) mampu menghambat pertumbuhan parasit berturut-turut sebesar $69,5 \pm 2,2\%$, $80,8 \pm 1,4\%$ dan fraksi B secara berturut-turut sebesar $40,3 \pm 2,4\%$, $41,3 \pm 2,4\%$.

Gambar 1 dan 2 menunjukkan persentase penghambatan pertumbuhan untuk masa inkubasi 72 jam lebih besar dibandingkan dengan 24 jam, hal ini menunjukkan lamanya masa inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas antiplasmodium dari fraksi. Semakin lama masa inkubasi semakin besar aktivitas antiplasmodiumnya. Untuk mengetahui nilai IC_{50} dari fraksi A dan B dilakukan analisa probit. Nilai IC_{50} menunjukkan besarnya konsentrasi dari fraksi yang dapat menghambat 50 % pertumbuhan parasit. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar efektivitas penghambatan fraksi terhadap pertumbuhan parasit.

Tabel I terlihat nilai IC_{50} dari fraksi A pada strain FCR-3 maupun D10 memiliki aktivitas antiplasmodium yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi B sehingga potensial untuk diteruskan lebih lanjut. Gessler *et al* (1994) menyebutkan bahwa untuk sediaan uji yang memiliki nilai $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ termasuk kedalam golongan bahan yang mempunyai aktivitas antiplasmodium yang sangat kuat. Semakin lama masa inkubasi mempengaruhi nilai IC_{50} baik pada fraksi A maupun B. Semakin lama masa inkubasi

menyebabkan aktivitas antiplasmodium yang semakin besar. hal ini kemungkinan karena semakin lamanya kultur terpapar dengan sediaan uji. Inkubasi 24 jam dibutuhkan karena plasmodium dalam fasa ring dan akan kembali ke fasa ring berikutnya dalam waktu 48 jam sehingga fasa ring pada inkubasi 72 jam telah terjadi maturasi

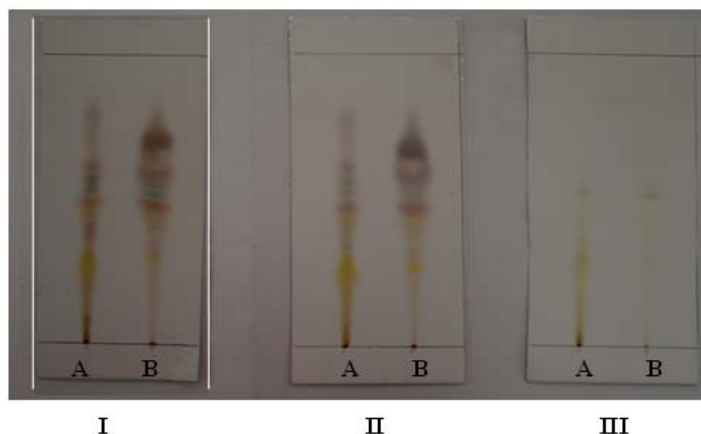
Hasil identifikasi tersaji pada Gambar 3. Dari kromatogram yang tersaji (Gambar 3) terlihat bahwa dengan sinar biasa setelah disemprot dengan uap amoniak, asam sulfat 10 % dalam metanol dan Lieberman-Burchard, fraksi A terlihat menunjukkan dua bercak sedangkan pada fraksi B tiga bercak dengan harga Rf berbeda. Pada deteksi dengan sinar biasa sebelum disemprot asam sulfat 10 % dalam metanol dan Lieberman- Burchard fraksi A menunjukkan dua bercak sedangkan fraksi B dua bercak yang berwarna kuning. Setelah disemprot fraksi A menunjukkan empat bercak dan B enam bercak yang berwarna biru ungu sampai coklat yang diduga merupakan golongan senyawa steroid/ triterpenoid. Gambar 3 (Lempeng III) setelah diuapi amoniak pada fraksi A terdapat dua bercak dan B tiga bercak yang berwarna kuning yang diduga merupakan golongan senyawa flavonoid sebelum disemprot, fraksi A dan B mengandung satu bercak.

Gambar 4 (A) pengamatan dibawah sinar UV_{254} pada lempeng (III) setelah diemprot uap amoniak tampak adanya peredaman sedangkan pada (B), lempeng (I) dan (II), pengamatan UV_{366} berfluoresensi kuat. Dari hasil identifikasi pendahuluan tersebut menunjukkan pada fraksi A dan B terdapat golongan senyawa steroid/ triterpenoid dan golongan flavonoid.

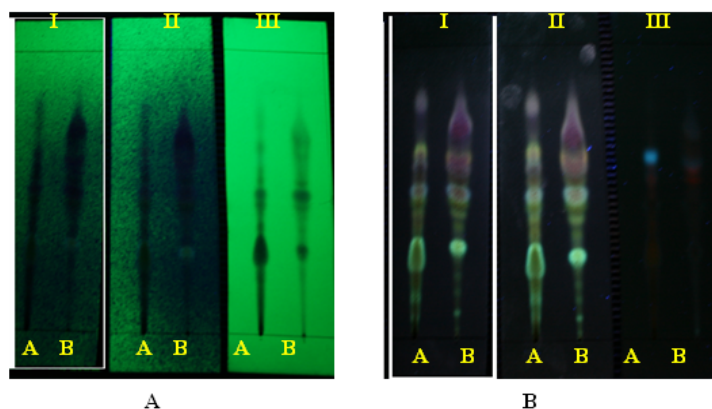
Xu *et al.*, (2001) berhasil mengisolasi senyawa xanton dari kulit batang *G. parvifolia* yaitu parvixanton. Senyawa xanton telah dibuktikan aktivitas antiplasmodium oleh Ignatushechenko *et al.*, (1997) yang ternyata memiliki aktivitas antiplasmodium yang kuat.

Tabel I. Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL} \pm \text{S.E.M}$) dari fraksi A dan B pada kultur *P. falciparum*

Masa inkubasi	FCR-3		D10	
	A	B	A	B
24 jam	$9,15 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$	$27,90 \pm 2,57 \mu\text{g/mL}$	$2,51 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$	$9,78 \pm 1,14 \mu\text{g/mL}$
72 jam	$2,79 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$	$12,30 \pm 1,21 \mu\text{g/mL}$	$1,52 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$	$4,66 \pm 1,24 \mu\text{g/mL}$



Gambar 3. Profil Kromatogram pada sinar biasa setelah disemprot dengan asam sulfat dalam metanol (I), Liberman-Burchard (II) dan uap amoniak (III)



Gambar 4. Profil Kromatogram setelah disemprot asam sulfat dalam metanol (I), Liberman buchard (II) dan uap amoniak (III) yang dilihat pada sinar UV₂₅₄ (A) dan UV₃₆₆ (B).

Likhitwitayawuid, *et al* (1998a dan 1998b) telah berhasil menguji aktivitas beberapa turunan xanton dari tanaman *G. dulcis* dan *G. cova*. Diantara turunan xanton yang diuji, garciniaxanton dan cowaxanton yang mempunyai aktivitas antiplasmodium paling kuat dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 0,96 µg/mL dan 1,5 µg/mL. Beberapa turunan senyawa triterpen dan sterol dilaporkan juga memiliki aktivitas antiplasmodium antara lain ekstrak kloroform kulit batang *Proteum heptaphyllum* yang pada dosis 250 mg/kgBB mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei* sebesar 58 % pada mencit sedangkan pada kultur *P. falciparum* memiliki nilai IC₅₀ sebesar 4 µg/mL, hasil

isolasi dan identifikasi kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak kloroform antara lain α-amirin, β-amirin, stigmasterol dan sitosterol (Rudiger *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil identifikasi pada KLT diatas kemungkinan golongan senyawa kimia yang terdapat pada kedua fraksi yaitu steroid/ triterpenoid dan golongan flavonoid bertanggung jawab terhadap aktivitas antiplasmodium pada kedua fraksi tersebut.

Kesimpulan

- Fraksi A ekstrak n-heksana kulit batang asam kandis (*G. parvifolia* Miq) memiliki aktivitas antiplasmodium lebih kuat pada

kultur *P. falciparum* galur FCR-3 dan D10 dibandingkan dengan fraksi B.

- Kandungan senyawa aktif dalam kedua fraksi tersebut kemungkinan yang berperan adalah senyawa golongan triterpenoid, steroid dan atau flavonoid sesuai dengan hasil identifikasi pada KLT.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada dr. Etty Nurwening Solikhah, M.Kes dari bagian Farmakologi FK-UGM dan dr. Mahardika, M.Kes dari bagian Parasitologi, FK-UGM yang telah membantu dalam pelaksanaan uji antiplasmodium secara *in vitro*.

Daftar Pustaka

- Anonim., 2001. *Standar Pengawasan Program Bidang Kesehatan Pemberantasan Penyakit Menular*. Inspektorat Jenderal DepKes RI, hal 5.
- Finney, D.J., 1964. *Probit Analysis; A Statistical treatment of the sigmoid response curve*, Cambridge.67-79.
- Gessler, M.C., Nkunya, M.H.N., Mwasumbi, L.B., Heinrich, M., and Toner, M., 1994. Screening Tanzanian Medicinal Plants for Antimalarial Activity. *Acta. Trop.* 55, 65 - 67.
- Ignatushenchenko., Winter RW., Bachinger HP., Hinrichs DJ., and Riscoe MK., 1997. Xanthonas as antimalarial agents, studies of a Possible Mode of Action. *FEBS Letter.* 409:67-73.
- Likhitwitayawuid., Phadungcharoen T., and Krunkai, J., 1998a. Antimalaria Xanthonas from *Garcinia cova*. *Planta Medica.* 64, 70 - 72.
- Likhitwitayawuid., Chanmahasathien., Ruangrunsi., and Krunkai, J., 1998b. Xanthonas with antimalarial activity fro *Garcinia dulcis*. *Planta Med*, 64, 281 - 282.
- Rudiger, A.L., Siani, A.C., Junior, V.F. 2007. The chemistry and Pharmacology of the South American genus *Proteum* Burn.f. (Burseraceae). *Pharmacogn Rev* 1, 93 - 104.
- Syamsudin., Soesanto Tjokrosonto,Subagus Wahyuono, Darmono and Mustofa., 2007. In vitro and in vivo antiplasmodial activities of Stem barks extracts from *Garcinia parvifolia* Miq. *Int. J. of. Trop. Med* 2, 41 - 44.
- Trager, W and Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673 - 676.
- WHO. 1997. The situation of malaria in the world in 1994. *J. Epid. Week*, 72, 269 - 92.
- Xu.J.Y, Lai Y.H, Imiyabir. Z, and Goh S.H., 2001. Xanthonas from *Garcinia parvifolia*. *J. Nat. Prod.* 64, 1191 - 1995.

* Korespondensi : Drs. Syamsudin, M.Biomed., Apt.
Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jakarta
Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12460
Telp. 021-7864727 E-mail: syamsudin27@yahoo.com