



9 772686 250000

e-ISSN : 2686-2506



## Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Ekstrak Etanol Daun Cambai Utan (*Piper porphyrophyllum*)

Arnida\*, Nurlely, Nani Kartinah, Sutomo

Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin 70124

\*Email korespondensi: arnida01@ulm.ac.id

(Submit 15/03/2019, Revisi 05/09/2019, Diterima 20/12/2019)

### Abstrak

Resistensi *Plasmodium* terhadap obat malaria mengakibatkan kegagalan pengobatan. Oleh karena itu ketersediaan antimalaria baru sangat diperlukan untuk melawan resistensi. Pencarian obat baru terus dilakukan melalui berbagai cara termasuk eksplorasi tanaman yang berpotensi sebagai antimalaria. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas penghambatan polimerisasi hem dari ekstrak etanol daun Cambai Utan (*Piper porphyrophyllum*) berdasarkan nilai  $IC_{50}$ . Pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi hem merupakan suatu metode pengujian awal untuk mengetahui potensi antimalaria. Prinsipnya secara *in vitro* menyerupai mekanisme kerja antimalaria yang menghambat terjadinya polimerisasi hem di dalam *Plasmodium*. Sampel dan kontrol positif (klorokuin) dibuat peirngakat konsnetrasi, direaksikan dengan hematin dan asam asetat glasial kemudian diukur absorbansinya pada *Elisa Reader* panjang gelombang 405 nm, yang dipersamakan pada kurva baku. Nilai persen penghambatan *versus* konsentrasi dianalisis dengan analisis probit sehingga diperoleh nilai  $IC_{50}$ . Persamaan kurva baku yang diperoleh yaitu :  $y = 0,011x + 0,247$ . Penghambatan polimerisasi hem ekstrak etanol daun *P. porphyrophyllum* masing-masing konsentrasi 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; dan 0,3125 mg/mL adalah berturut-turut  $91,82 \pm 5,47\%$  ;  $84,57 \pm 6,18\%$  ;  $77,28 \pm 7,81\%$  ;  $68,46 \pm 7,51\%$  ;  $57,24 \pm 6,23\%$  ;  $40,50 \pm 7,52\%$  . Nilai  $IC_{50}$  diperoleh menggunakan analisis probit. Analisis probit menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  rata-rata untuk ekstrak adalah  $0,47 \pm 0,09$  mg/mL, sedangkan rata-rata  $IC_{50}$  dari klorokuin adalah  $4,67 \pm 1,17$  mg/mL. Ekstrak etanol daun *P. porphyrophyllum* memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem dengan nilai  $IC_{50}$   $0,47 \pm 0,09$  mg/mL.

Kata kunci: Cambai Utan, *Piper porphyrophyllum*, Heme Polimerization Inhibitory, Polimerisasi hem

### Outline

- Pendahuluan
- Metode
- Hasil dan Pembahasan
- Kesimpulan
- Ucapan Terima Kasih
- Daftar Pustaka

## Pendahuluan

Penyebab gagalnya pemberantasan malaria adalah munculnya resistensi *Plasmodium* terhadap antimalaria dan resistensi vektor terhadap insektisida. Beberapa jenis nyamuk *Anopheles* (vektor) telah resisten terhadap insektisida seperti DDT sehingga mengakibatkan peningkatan jumlah kasus penyakit malaria di beberapa negara tropis<sup>1</sup>. Munculnya resistensi *Plasmodium* terhadap obat malaria mengakibatkan kegagalan pengobatan.

Pencarian obat baru terus dilakukan melalui berbagai cara termasuk eksplorasi dan pengembangan bahan alam serta sintesis obat untuk memperoleh obat yang efektif. Aktivitas antimalaria bahan alam dapat dibuktikan dengan beberapa pengujian, salah satunya adalah pengujian penghambatan polimerisasi hem. Penghambatan polimerisasi hem merupakan uji skrining awal aktivitas antimalaria<sup>2</sup>. Daun Cambai Utan (*Piper porphyrophyllum*) dipilih berdasarkan kandungan metabolit sekunder yang mengandung alkaloid. Senyawa tumbuhan yang terbukti memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem adalah senyawa fenolik seperti flavonoid, antrakuinon, tannin, saponin, terpenoid, golongan alkaloid<sup>3</sup>, dan glikosida<sup>4</sup>.

## Metode

### A. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: daun *P. porphyrophyllum*, akuades, aluminium foil, amonia, asam asetat anhidrat, asam asetat glasial *p.a.*, DMSO *p.a.*, kain flanel, kertas saring, klorokuin difosfat *p.a.*, kristal hematin *p.a.*, Metanol, NaOH, etanol 96%. Daun *P. porphyrophyllum* diambil dari desa Guntung Manggis Kecamatan Landasan Ulin Kabupaten Banjarbaru Provinsi Kalimantan Selatan.

### B. Metode

#### 1. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi yaitu perendaman sampel dengan pelarut etanol 96%. Serbuk daun *P. porphyrophyllum* sebanyak 100 g dimasukkan dalam alat maserasi. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dan diremaserasi sebanyak 3 kali.

#### 2. Preparasi Uji penghambatan polimerisasi hem

- a) Pembuatan larutan NaOH 0,2 M dilakukan dengan menimbang 200 mg kristal NaOH, kemudian dilarutkan dengan akuades 10 mL, kemudian digojok, dicukupkan volumenya sampai 25 mL.
- b) Pembuatan Larutan NaOH 0,1 M dilakukan dengan cara sebanyak 12,5 mL larutan NaOH 0,2 M dimasukkan ke dalam labu ukur ditambahkan akuades sampai 25 mL.
- c) Pembuatan larutan hematin 1 mM sebanyak 10 mL dalam larutan NaOH 0,2 M, sebanyak 6,3349 mg kristal hematin ditimbang saksama dan dilarutkan dengan NaOH 0,2 M sampai larutan mencapai 10 mL.
- d) Pembuatan kurva baku hematin, seri kadar larutan hematin dibuat dengan konsentrasi: 250, 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; dan 3,90625  $\mu$ M. Masing-masing konsentrasi sebanyak 100  $\mu$ L dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* dan dilakukan pembacaan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dengan ELISA Reader.

- e) Pembuatan larutan uji, sampel dibuat dengan konsentrasi 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/mL. Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin dengan konsentrasi yang sam dengan sampel uji.
- f) Uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem <sup>4</sup>.

Bahan uji dengan berbagai tingkatan kadar ditambahkan sebanyak 50  $\mu$ L, yaitu 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; dan 0,3125 mg/mL. Replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing kadar. Sebanyak 100  $\mu$ L larutan hematin 1 mM dalam NaOH 0,2 M dimasukkan ke dalam mikrotube. Dalam memulai reaksi polimerisasi hem, ditambahkan 50  $\mu$ L larutan asam asetat glasial 100 % (pH 2,6) pada mikrotube yang sudah berisi larutan hematin dan sampel, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Sebagai kontrol positif adalah klorokuin dengan konsentrasi 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; dan 0,3125 mg/mL, sedangkan sebagai kontrol negatif adalah larutan DMSO 10% dan aquades. Setelah inkubasi berakhir, mikrotube disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatannya dibuang, endapan dicuci sebanyak 3 kali dengan 200  $\mu$ L DMSO 100%. Masing-masing pencucian dengan cara disentrifuse berkecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh ditambah 200  $\mu$ L NaOH 0,1 M. Setiap 100  $\mu$ L larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam mikroplate 96 sumuran dan dibaca nilai absorbansinya dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh diplot ke persamaan garis regresi linear kurva standar sehingga dapat ditentukan konsentrasi  $\beta$ -hematin bahan uji pada setiap sumuran

## Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstraksi diperoleh bobot ekstrak 12,35 gram, dari 100 gram berat sampel, sehingga rendemennya sebesar 12,35%. Konsentrasi larutan seri kadar hematin yang digunakan yaitu 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; dan 3,90625  $\mu$ M. Masing-masing konsentrasi tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm dan dibuat kurva hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). Persamaan kurva baku yang diperoleh yaitu :  $y = 0,011x + 0,247$  dengan nilai koefisien korelasi (r) yang dihasilkan adalah sebesar 0,997 dan nilai  $r^2$  yang dihasilkan yaitu 0,994 (Gambar 5). Kadar  $\beta$ -hematin dari sampel uji maupun kontrol diperoleh dengan cara memasukkan harga absorbansi masing-masing bahan uji dan kontrol tersebut ke dalam persamaan kurva standar hematin yaitu:  $y = 0,011x + 0,247$  dengan y adalah absorbansi dan x adalah kadar  $\beta$ -hematin. Nilai  $IC_{50}$  ini diperoleh menggunakan analisis probit. Analisis probit menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  rata-rata untuk ekstrak adalah  $0,47 \pm 0,09$  mg/mL. Sedangkan rata-rata  $IC_{50}$  dari klorokuin adalah  $4,67 \pm 1,17$  mg/mL (Tabel 1 dan Lampiran 1). Klorokuin berfungsi sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 10% berfungsi sebagai kontrol negatif untuk ekstrak. Selain itu, aquades berfungsi sebagai kontrol negatif dari klorokuin. Kontrol negatif tersebut berperan penting dalam penghitungan nilai persen penghambatan.

Uji penghambatan polimerisasi hem yang dilakukan pada ekstrak daun *P. porphyrophyllum* ini merupakan reaksi kimiawi yang meniru suasana pada sel hidup yaitu pada eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium*. Pada suasana asam, hematin akan berpolimerisasi menjadi kristal  $\beta$ -hematin. Semakin banyak kristal  $\beta$ -hematin yang terbentuk, maka warna larutan (setelah kristal dilarutkan kembali dalam larutan natrium hidroksida 0,1 M) akan semakin pekat sehingga nilai absorbansi juga semakin besar. Dengan kata lain, senyawa uji yang mampu menghambat polimerisasi hematin ini akan

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

Bahan	Konsentrasi (mg/mL)	Rerata Kadar Hemozoin ± SD	Rerata % Penghambatan ± SD	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	
Uji	10	15,97	91,82 ± 5,47	0,47 ± 0,09	
	5	30,121	84,57 ± 6,18		
Ekstrak	2,5	44,364	77,28 ± 7,81		
	1,25	61,576	68,46 ± 7,51		
	0,625	83,485	57,24 ± 6,23		
	0,3125	116,152	40,50 ± 7,52		
Klorokuin	10	61,32	58,57 ± 4,04		4,67 ± 1,17
	5	66,68	54,94 ± 2,99		
	2,5	86,86	41,31 ± 4,30		
	1,25	104,45	29,42 ± 3,39		
	0,625	116,14	21,53 ± 6,12		
	0,3125	124,36	15,97 ± 7,56		

mengurangi kristal  $\beta$ -hematin yang terbentuk, sehingga semakin aktif senyawa uji, maka warna larutan akan semakin tidak berwarna serta nilai absorbansi akan semakin kecil<sup>3</sup>.

Hal tersebut terlihat pada uji penghambatan polimerisasi hem ekstrak etanol daun *P. porphyrophyllum*, pada mikroplate warna larutan semakin lemah dengan semakin bertambahnya konsentrasi. Maka dapat disimpulkan semakin bertambahnya konsentrasi ekstrak etanol daun *P. porphyrophyllum*, maka semakin bertambah besar aktivitas penghambatan polimerisasi hemnya. Hal lain, perlakuan yang dilakukan pada uji ini yaitu dilakukan pada suhu 37° C dan diinkubasi selama 24 jam karena pada suhu dan waktu tersebut, kristal  $\beta$ -hematin yang terbentuk adalah optimal<sup>5</sup>.

Aktivitas penghambatan polimerisasi hem dinyatakan dalam *Inhibition Concentration* 50% (IC<sub>50</sub>) yaitu kadar ekstrak yang mampu menghambat polimerisasi hem hingga 50%. Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem jika mempunyai nilai IC<sub>50</sub> penghambatan polimerisasi hem lebih kecil dari nilai IC<sub>50</sub> klorokuin sulfat, yaitu 37,5 mM (12 mg/mL)<sup>2</sup>. Berdasarkan kriteria tersebut di atas maka ekstrak etanol daun *P. porphyrophyllum* dapat dikatakan memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> yaitu 0,47 ± 0,09 mM.

### Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun *P. porphyrophyllum* memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 0,47 ± 0,09 mg/mL.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada dekan Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat atas pendanaan melalui Program Dana DIPA; kepada Kepala Balai Veteriner Regional Kalimantan atas fasilitas *Elisa Reader*.

## Daftar Pustaka

1. Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, P., 2004, *Traditional Medicinal Plants And Malaria*, CRC Press, Boca Raton, 30, 260.
2. Baelsmans, R., E. Deharo, V. Munoz, M. Sauvain & H. Ginsburg. 2000. Experimental Conditions for Testing the Inhibitory Activity of Chloroquine on the Formation of  $\beta$ -Hematin, *Experimental Parasitology*. 42: 55-60.
3. Wahyono, Pudjono & P. Widyati. 2010. Uji Aktivitas Senyawa Antiplasmodium dari Fungi Endofit Tanaman *Artemisia annua* L. *Majalah Farmasi Indonesia*. 21 : 230-235.
4. Arnida. 2015. *Isolasi dan Uji Aktivitas Antiplasmodium In Vitro Senyawa Aktif dari Umbi Hati Tanah (Angiopteris evecta)*. Disertasi, Program Pasca Sarjana Program Studi Ilmu Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
5. Basilico, N., E. Pagani, D. Monti, P. Olliaro, & 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.