

UJI PREKLINIS FRAKSI ETIL ASETAT DAUN JALOH (*Salix tetrasperma* Roxb.) SEBAGAI ANTIPLASMODIUM SECARA *IN VITRO*

IN VITRO PRECLINICAL TEST OF ETHYL ACETATE FRACTION OF WILLOW LEAVES (*Salix tetrasperma* Roxb.) AS ANTIPLASMODIUM

Nuzul Asmilia¹, Sugito¹, Amalia Sutriana²

¹Laboratorium Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala
²Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala
nuzulasmilia@yahoo.com

ABSTRACT

The aims of the present study was to find out the *in vitro* activity of ethyl acetate fraction of willow leaves (*Salix tetrasperma* Roxb.) on *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) growth. Synchronized malaria isolate was cultured and divided into five treatment groups, each group was allotted into three concentration levels (64 µg/ml, 256 µg/ml, 1024 µg/ml). The growth level of *P. falciparum* on thick blood smear sample stained with 3% Giemsa was observed using microscope 48 hours after incubation. The data of *P. falciparum* growth were analyzed using two way analysis of variance (two way ANOVA) and the difference found among treatment were subjected to Duncan's test ($P < 0.05$). The result showed that there was significance effect among treatment groups and concentration levels used in this study on the *P. falciparum* growth ($p < 0.05$). The group of B fraction was more able to inhibit the growth of *P. falciparum* compared to others groups. The higher concentration was used, the more the growth inhibition can be observed. It could be concluded that the B fraction of willow leaves extract with the higher concentration are able to inhibit *P. falciparum* growth *in vitro*.

Key words: Willow leaves, *P. falciparum*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi ekstrak ethyl asetat daun jaloh terhadap derajat pertumbuhan dan perkembangan *P. falciparum* secara *in vitro*. Isolat malaria yang telah disinkronisasi dikultur dalam 5 kelompok perlakuan (fraksi ekstrak ethyl asetat daun jaloh), masing-masing perlakuan dibagi menjadi 3 tingkat konsentrasi (64 µg/ml; 256 µg/ml; dan 1024 µg/ml). Pengamatan derajat pertumbuhan *P. falciparum* dilakukan setelah 48 jam inkubasi dengan menggunakan mikroskop dari sediaan darah hapus tebal yang diwarnai dengan Giemsa 3 %. Data pertumbuhan *P. falciparum* dianalisa dengan ANOVA dua arah dan untuk melihat perbedaan antar perlakuan data di uji dengan uji Duncan dengan tingkat kepercayaan 5 %. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan dan tingkat konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini terhadap derajat pertumbuhan *P. falciparum* ($p < 0,05$). Kelompok perlakuan fraksi B menghasilkan derajat penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* yang lebih tinggi deranding kelompok-kelompok lain. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, semakin tinggi hambatan pertumbuhan yang teramati. Kesimpulan penelitian adalah fraksi B dari ekstrak daun jaloh dengan konsentrasi tinggi mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.

Kata kunci: daun jaloh, *P. falciparum*

PENDAHULUAN

Penyakit malaria masih merupakan masalah di bidang kesehatan pada negara-negara tropis khususnya negara berkembang termasuk Indonesia. Usaha eradikasi malaria oleh WHO pada era tahun 1950-an terhadap kejadian penyakit malaria mengalami penurunan (Upcroft, 2001). Akhir-akhir ini kenyataan memperlihatkan bahwa penularan malaria di daerah tropis mulai meningkat dan hampir kembali kepada keadaan saat sebelum usaha eradikasi malaria dilakukan. Timbulnya resistensi vektor malaria terhadap insektisida dan resistensi parasit *P. falciparum* terhadap obat-obatan anti malaria seperti kloroquin dan fansidar menyebabkan usaha eradikasi malaria menjadi lebih sulit (Carter dan Mendis, 2002)

Berbagai upaya telah dilakukan untuk menemukan antimalaria sebagai pengganti beberapa jenis antimalaria yang telah resisten terhadap *Plasmodium* spp. Metabolit sekunder asal tanaman obat merupakan sumber sangat potensial untuk menemukan obat antimalaria (Willcox dan Bodeker, 2004). Jenis tanaman obat yang telah terbukti efektif mencegah perkembangan plasmodium dalam tubuh inang adalah tanaman *Artemisia annua* yang menghasilkan senyawa bioaktif artemisinin (Willcox dan Bodeker, 2004) dan tanaman *Dichroa febrifuga* Lour yang menghasilkan senyawa bioaktif febrifugin. Senyawa febrifugin ini memiliki potensi sebagai anti malaria mencapai 100 kali dibandingkan quinin yang diujicobakan pada itik yang diinfeksi *P. lophurae* (Jiang, dkk, 2005).

Di Aceh, khususnya di Kabupaten Aceh Besar, penduduk setempat telah menggunakan jaloh (*bak*

sijalöh) sebagai obat tradisional dalam pengobatan penyakit malaria. Bukti empiris menunjukkan bahwa penderita demam malaria mengalami kesembuhan setelah beberapa kali meminum air perasan daun jaloh tersebut. Hilangnya gejala demam dan tidak munculnya kembali gejala demam pada penderita malaria kemungkinan disebabkan karena pada bagian tanaman jaloh ini terdapat senyawa bioaktif yang dapat menghambat atau membunuh Plasmodium.

Secara ilmiah, tanaman *Salix* spp juga telah terbukti sebagai bahan obat antipiretik (Fabricant dan Farnsworth, 2001), antiinflamasi (Fiebich dan Chrubasik, 2004), (Khayyal, dkk, 2005) dan antioksidan (Kahkonen, 1999). Hasil analisis pada beberapa spesies *Salix* (seperti *Salix alba*; *S. daphnoides*, *S. purpurea*, *S. matsudana*) umumnya mengandung senyawa glikosida, seperti salisin. Selain itu, diidentifikasi juga beberapa senyawa terpen, flavonoid, dan beberapa jenis steroid (Chrubasik, dkk, 2001; Du, dkk, 2004; Zheng, dkk, 2005; Kammerer, dkk, 2005).

Berdasarkan data empiris dan ilmiah tersebut telah dilakukan penelitian pendahuluan pada tanaman jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb) untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun jaloh sebagai antiplasmodium secara *in vitro*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas fraksi ekstrak *ethyl acetat* daun jaloh terhadap derajat pertumbuhan dan perkembangan *P. falciparum* secara *in vitro*

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Unsyiah dan Balitbangkes

Jakarta

Bahan yang digunakan adalah daun jaloh, Isolat *P. falciparum* galur lokal, medium RPMI 1640 (Gibco); Larutan sodium bicarbonat, Larutan HEPES, sediaan eritrosit, Human serum, Darah penderita, D-sorbitol 5 % dan aquadest, NaOH, *Ferri protoporphirin IX*, Pyridine, *Potassium ferricyanide* ($K_3 Fe (CN)_6$), Sodium hidrosulfit, Triton X-100 1 %, Artemisinin pro analisis, *Chloroquine diphosphate* pro analisa, Aquadest steril, Buffer, Giemsa dan Isolat *Plasmodium falciparum* galur lokal yang diperoleh dari NAMRU.

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat ekstraktor soxhlet padat cair dengan labu destilasi, Water bath (penangas air), Blender, Neraca analitik, Sonikator, *Rotary evaporator*, Erlenmeyer 100 ml, Water pump, Evaporator, Lempeng KLT silika gel 60 GF 254 (Merck), Lampu UV (Camag), Kromatografi kolom dari kaca, Penguap putar (vacum rotavapor) Buchi, *Spektrofotometer UV-Vis* (Shimadzu UV 1601), Mikroskop flourescens, Mikroplate reader, Laminar air flow, Incubator CO₂, Centrifuge biasa, Centrifuge dingin, Cultur flask, Cultur well, Mikro filter 0,2 um, Objek glass dan Cuvet disposable.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan lima kelompok perlakuan (Fraksi A, B, C, D, dan E) dan faktor Dosis (dosis; 64 µg/ml, 256 µg/ml dan 1024 µg/ml). Masing-masing kelompok diulangi sebanyak dua kali.

Ekstrak bahan uji yang digunakan adalah ekstrak yang sudah dibuat pada penelitian sebelumnya. Pembuatan ekstrak bahan uji telah dilakukan di Fakultas MIPA Kimia Unsyiah dengan menggunakan ekstraksi secara maserasi. Daun

dibuat simplisia dengan mengeringkan pada suhu kamar dan tidak terkena matahari langsung. Simplisia daun Jaloh diekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol, selanjutnya ekstrak dipartisi dengan n-hexan dan residu dipartisi lagi dengan pelarut ethyl asetat, kemudian filtrat yang diperoleh dikumpul dan diuapkan (dikentalkan) menggunakan alat penguap berputar (*rotary evaporator*) yang dilengkapi penangas air dan pompa vakum.

Isolasi senyawa ekstrak ethyl asetat daun Jaloh dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan silika gel GF₂₅₄ sebagai fasa diam dan ethyl asetat : n-heksana (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 dan 5:5) sebagai fasa gerak. Sampel dimasukkan kedalam kolom yang telah berisi fasa diam kemudian dielusi dengan fase gerak. Setiap fraksi yang diperoleh ditampung pada setiap 100 ml, dan setiap fraksi dilakukan Kromatografi Lapis Tipis. Fraksi yang mempunyai pola noda yang sama digabungkan dan dilakukan uji anti plasmodium secara *in vitro*

Uji antiplasmodium dari fraksi ekstrak ethyl asetat daun jaloh dilakukan secara in vitro dan merujuk pada metode yang dikembangkan oleh peneliti terdahulu. Kegiatan yang dilakukan meliputi persiapan medium, pembiakan *Plasmodium*, sinkronisasi dan evaluasi aktivitas antiplasmodium dari fraksi *ethyl acetat* daun jaloh dalam berbagai tingkat dosis.

Parasit malaria yang digunakan untuk uji, dibiakan menggunakan modifikasi metode. pembiakan dilakukan pada *flash cultur* dan dikerjakan secara aseptik. Untuk pengujian antiplasmodium ini, digunakan cara tes mikro yang didasarkan pada teknik WHO. Bahan uji Fraksi ekstrak *ethyl acetat* daun jaloh dilarutkan dalam DMSO, kemudian diencerkan sampai kadar tertentu

dalam medium RPMI 1640 yang dilengkapi 10 % serum manusia, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO₃. Larutan disterilkan dengan mikrofilter 0,2 um dan 0,45 um dan diencerkan secara seri. Masing-masing well atau sumur mikro diisi dengan larutan bahan uji fraksi ekstrak ethyl acetat daun jaloh yang ditambah suspensi eritrosit 5 % dengan tingkat parasitemia 1 % sehingga masing-masing sumur mikro berisi 200 ul medium yang mengandung serum dan bahan uji dengan dosis 64µg /ml, 256µg /ml, dan 1024µg /ml. Selanjutnya kultur kedalam lempengan sumur mikro dan disimpan dalam inkubator selama 48 jam.

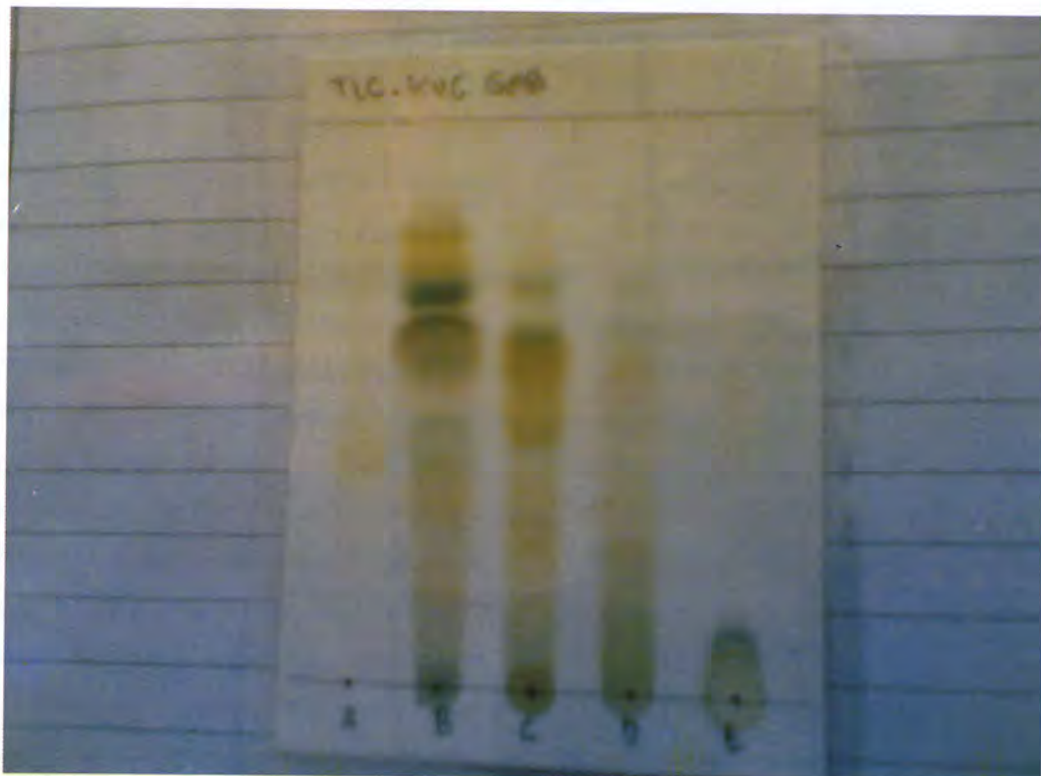
Pengamatan pertumbuhan *P. falciparum* yang terkandung dalam biakan dilakukan melalui preparat hapus darah tebal dengan pewarnaan giemsa 5 %. Evaluasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektrik biokuler dengan pembesaran 10

x 100 dan data yang dihitung adalah jumlah skizon hidup dengan minimal 3 inti terhadap 200 aseksual parasit *P. falciparum*. Persentase penghambatan ekstrak daun jaloh berbagai fraksi terhadap pertumbuhan *P. falciparum* dihitung dengan cara membandingkannya dengan kontrol

Data persentase daya hambat yang diperoleh dianalisa dengan uji beda ANOVA menggunakan Program SPSS (Versi 14). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji berganda Duncant

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabungkan dan dipekatkan sehingga diperoleh 5 fraksi gabungan (fraksi A-E). (Gambar.2)



Gambar 2. Kromatogram hasil KLT Gabungan

Hasil dari pemisahan kromatografi kolom gravitasi menghasilkan 63 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut dilakukan KLT untuk menganalisa

komponen-komponennya dan fraksi yang memiliki noda yang sama digabung, sehingga fraksi gabungan yang dihasilkan adalah 5 fraksi (Tabel 1).

Tabel 1. Tabel fraksi-fraksi dari ekstrak *ethyl acetat* daun jaloh gabungan

Ekstrak ethyl asetat daun jaloh				
Fraksi A (1-7)	Fraksi B (8-13)	Fraksi C (14-20)	Fraksi D (21-27)	Fraksi E (28-63)

Uji aktivitas anti malaria secara *in vitro* dengan menggunakan biakan *P.falciparum* digunakan sebagai uji pendahuluan untuk mengevaluasi bahan alam hayati yang prospektif sebagai antimalaria.

Hasil pengamatan skizon yang hidup per 200 parasit aseksual menunjukkan bahwa masing-masing Fraksi gabungan mampu menghambat pertumbuhan *P.falciparum* secara *in vitro*.

Tabel 2. Rata-rata (\pm SD) Persentase Daya Hambat Pertumbuhan *P. falciparum* pada berbagai kelompok perlakuan setelah dikultur selama 48 jam

Dosis (μ g/ml)	Persentase Daya Hambat Pertumbuhan <i>P. falciparum</i>					Rata-rata
	Fraksi A	Fraksi B	Fraksi C	Fraksi D	Fraksi E	
64	9,67	26,66	25,80	20,00	9,37	18,3 \pm 9,0 ^A
	6,66	25,80	26,66	25,80	6,66	
256	9,67	23,33	22,58	40,00	43,75	28,03 \pm 14,2 ^B
	6,66	22,58	23,33	45,16	43,33	
1024	41,93	96,66	51,61	56,66	87,5	65,91 \pm 22,1 ^C
	43,33	93,54	43,33	61,29	83,3	
Rata-rata	19,65 \pm 17,8 ^a	48,09 \pm 36,4 ^b	32,21 \pm 12,2 ^c	41,48 \pm 16,4 ^d	45,55 \pm 34,7 ^d	37,42 \pm 25,9

Ket: *Superskrip* huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Hasil analisis statistik terhadap persentase daya hambat pertumbuhan *P. falciparum*, menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara 5 kelompok perlakuan bahan uji (Fraksi gabungan ekstrak *ethyl acetat* daun jaloh Fraksi A, Fraksi B, Fraksi C, Fraksi D dan Fraksi E) . Kemampuan ekstrak daun jaloh meningkatkan daya hambat pertumbuhan *P.falciparum* secara nyata pada penelitian ini diduga karena adanya beberapa zat aktif dalam daun jaloh

yang mempunyai aktifitas antimalaria seperti alkaloid.

Tabel 2 di atas terlihat bahwa persentase daya hambat pertumbuhan *P. falciparum* pada masing-masing kelompok perlakuan mengalami peningkatan. Persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* pada setiap kelompok perlakuan meningkat seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Makin tinggi dosis perlakuan yang

diberikan menghasilkan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* yang semakin tinggi. Pada kelompok perlakuan Fraksi B persentase daya hambat pertumbuhan *P. falciparum* lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan Fraksi A dan Fraksi C. Fraksi E juga memperlihatkan persentase hambatan pertumbuhan *P. falciparum* diatas lima puluh persen.

Hasil analisis Uji Duncan menunjukkan bahwa persentase daya hambat pertumbuhan *P. falciparum* dari Fraksi A, B, C, D dan E berbeda secara nyata ($p < 0,05$). Persentase daya hambat pertumbuhan *P. falciparum* pada Fraksi D dan E tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Akan tetapi Fraksi B dan E mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* yang lebih baik dibandingkan dengan Fraksi A, C, dan D.

Pada penelitian ini juga terlihat bahwa pemberian tingkat dosis berpengaruh secara nyata ($p < 0,05$) terhadap persentase daya hambat pertumbuhan *P. Falciparum*, pada uji lanjut Duncan memperlihatkan berbeda nyata antara dosis. Secara garis besar persentase daya hambat pertumbuhan *P. falciparum* meningkat seiring dengan peningkatan dosis.

Hasil ini memperlihatkan bahwa aktivitas Fraksi B ekstrak ethyl acetat daun jaloh dalam menghambat pertumbuhan plasmodium paling tinggi dicapai pada dosis 1024 $\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 95,1 %. Fraksi E ekstrak ethyl asetat pada dosis 1024 $\mu\text{g/ml}$ (85,4%) Sedangkan perlakuan Fraksi D ekstrak ethyl asetat hanya mempunyai daya hambat 58,97% pada dosis yang sama.

Dari penelitian uji daya antiplasmodium 5 fraksi ekstrak ethyl asetat daun jaloh terhadap *P. falciparum* dapat disimpulkan bahwa Fraksi B ekstrak ethyl asetat daun jaloh mempunyai daya

hambat 95,1% pada dosis uji 1024 $\mu\text{g/ml}$.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Indonesia Managing Higher Education For Relevance and Efficiency (I-MHERE)-Batch II Tahun 2008 IBRD LOAN N0. 4789-IND dan IDA LOAN No. 40077-IND.

DAFTAR PUSTAKA

- Upcroft, P., Upcroft, J.A. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 150-164.
- Carter, R., Mendis, K.N. 2002. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 564-594
- Willcox, M.L., Bodeker G. 2004. Traditional herbal medicines for malaria. *BMJ* 329: 1156-1159
- Jiang, S., Zeng, Q., Gettayacamin, M., Tungtaeng, A., Wannaying, S., Lim, A., Hansukjariya, P., Okunji, CO., Zhu, S., Fang, D. 2005. Antimalarial activities and therapeutic properties of febrifugine analogs. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 49: 1169-1176.
- Chrubasik, S., Eisenberg, E, Balan, E, Weinberger, T, Luzzati, R., Conradt, C. 2000. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am. J. Med.* 109:9-14.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 109 (suppl 1):69-75.
- Fiebich, B.L, Chrubasik, S. 2004. Effects of an ethanolic salix extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine* 11:135-138.

- Khayyal, M.T, El-Ghazaly, M.A, Abdallah, D.M, Okpanyi, S.N, Kelber, O. 2005. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Arzneimittelforschung* 55:677-687.
- Kahkonen, MP., Hopia, AI, Vuorela, H.J., Rauha, JP., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinone, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Chrubasik, S., Kunzel, O, Model, A, Conradt, C and Black, A. 2001. Treatment of low back pain a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Rheumatology* 40:1388-1393.
- Du, Q., Jerz, G., Winterhalter, P. 2004. Preparation of three flavonoids from the bark of *Salix alba* by high-speed countercurrent chromatographic separation. *J Liq Chromat Rel Technol* 27:3257-3264.
- Zheng, YN., J. Zhang, LK. Han, K. Sekiya, Y. Kimura, H. Okuda. 2005. Effect of Compounds in leaves of *Salix matsudana* on arachidonic acid metabolism. *Yakugaku Zasshi.* 125:1005-1008.
- Kammerer, B., Kahlich, R, Biegert, C, Gleiter, C.H, Heide, L. 2005. HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem Anal* 16:470-478.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, (Penerjemah : Kosasih Padmawinata dan Iwan Soediro), Penerbit ITB, Bandung.
- Peters, W., 1987. *Chemotherapy and drugs resistance in malaria*, Vol 1, p.145-273. Academic Press, Inc., New York.
- World Health Organization, 2002. Death Diseases in Developmental Country, <http://www.who.int/nf.new/dnld/pdf/conclusion.pdf>.
- Stell, R.G.D., Torrie, J.H. 1990. Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometrik. Alih bahasa Bambang Sumantri, PT Gramedia Pustaka Utama: Jakarta