

## Aktivitas Penghambatan Ekstrak Etanol Daun *Cassia Spectabilis* Terhadap Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium berghei*

Wiwied Ekasari<sup>1\*</sup>, Nindya Tresiana P<sup>1</sup>, Suciati<sup>1</sup>, Tutik Sri Wahyuni<sup>1</sup>, Heny Arwaty<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pharmacognosy and Phytochemistry Departement, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Parasitology Department, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya

\*Corresponding author: wiwiedeka@hotmail.com

### Abstract

**Background:** Antimalarial screening against nine species of the genus *Cassia* showed that the methanol extract of leaves *Cassia spectabilis* have the highest activity. Since it will be used as a traditional medicine, hence it is needed further studies of antimalarial activity of these plants by choosing a safer solvent, namely ethanol. **Objective:** In vitro anti-malarial activity against *Plasmodium falciparum* was conducted using the method of Trager and Jensen. **Methods:** The serial solution tested were: 100, 10, 1, 0.1 and 0.01 µg/mL, while the in vivo test was performed based on Peter's test (The days suppressive test) that using *P. berghei* (strain ANKA) infected mice. **Results:** The results showed that ethanolic extract of *C. spectabilis* leaves has inhibitory activity against *P. falciparum* with IC<sub>50</sub> value of 12.52 µg/mL and against *P. berghei* with ED<sub>50</sub> value of 131.5 mg/kg body weight. **Conclusions:** A further study to see the potential of ethanol extract from *C. Spectabilis* leaves as anti-malaria is warranted.

**Keywords:** *C. spectabilis*, Antimalarial, *P. falciparum*, *P. berghei*

### Abstrak

Latar belakang: Hasil skrining antimalaria terhadap sembilan spesies dari genus daun *Cassia* menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *C. spectabilis* memiliki aktivitas yang terbesar. Karena akan digunakan sebagai obat tradisional, maka dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap aktivitas antimalaria dari tanaman ini memilih pelarut yang lebih aman, yaitu etanol. Pengujian aktivitas penghambatan terhadap *P. falciparum* secara *in vitro* dilakukan menggunakan metode Trager dan Jensen. Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan larutan uji seri 100, 10, 1, 0,1 dan 0,01 µg/mL. Sedangkan pengujian antimalaria secara *in vivo* dilakukan berdasarkan metode Peter yang dilakukan pada mencit terinfeksi *P. berghei* (strain ANKA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *C. spectabilis* memiliki aktivitas penghambatan terhadap *P. falciparum* dengan IC<sub>50</sub> sebesar 12,52 µg/mL dan terhadap *P. berghei* dengan ED<sub>50</sub> sebesar 131,5 mg/kg BB. Ekstrak etanol daun *C. spectabilis* potensial untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka mendapatkan zat aktif antimalaria yang terkandung di dalamnya

**Kata kunci:** *C. spectabilis*, Antimalarial, *P. falciparum*, *P. berghei*

## PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit yang penularannya melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina, dimana nyamuk tersebut telah terinfeksi protozoa dari genus *Plasmodium*. Pada 2015 dilaporkan, sekitar 3,2 miliar orang yang berarti hampir setengah dari populasi dunia berisiko terkena malaria. Sebagian besar kasus malaria dan kematian terjadi di sub-Sahara Afrika. Namun, Asia, Amerika Latin, dan pada tingkat lebih rendah Timur Tengah dan sebagian Eropa, juga berisiko. Dilaporkan juga 97 negara dan wilayah saat ini sedang berlangsung transmisi malaria (WHO, 2015).

Pemberantasan penyakit malaria makin menjadi problem dengan timbulnya resistensi terhadap obat-obat antimalaria yang ada, sehingga penemuan antimalaria baru baik dari bahan alam maupun sintesis masih terus diupayakan (Sjafruddin *et al.*, 2004; Kim and Schneider, 2013)

Berdasar hasil uji pendahuluan aktivitas antimalaria ekstrak metanol dari daun sembilan tanaman genus *Cassia* yaitu *C. moschata*, *C. javanica*, *C. grandis*, *C. spectabilis*, *C. multijuga*, *C. tora*, *C. Alata*, *C. garetiana*, dan *C. fistula* didapatkan hasil bahwa daun *C. spectabilis* terbukti paling aktif (Ekasari *et al.*, 2015). Untuk dapat digunakan sebagai obat tradisional, ekstrak yang digunakan haruslah berasal dari pelarut yang tergolong aman. Untuk itu dalam upaya pencarian bahan obat tradisional baru sebagai antimalaria, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas penghambatan daun *C. spectabilis* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* *in vitro* dan *P. berghei* *in vivo* menggunakan ekstrak etanol.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan Penelitian

Bahan Tanaman: Daun *C. Spectabilis* yang diperoleh dan dideterminasi di Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur.

### Parasit Uji

*In vitro*: *P. falciparum* yang digunakan adalah biakan *P. falciparum* strain 3D7 yang dibiakkan dengan metode Trager and Jensen (1976).

*In Vivo*: *Plasmodium berghei* strain ANKA yang berasal dari Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta dan dikembangkan di laboratorium hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya melalui kultivasi pada mencit.

### Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Balb-C yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Mencit yang digunakan adalah mencit dengan berat badan 20-30g.

### Pembuatan Ekstrak daun:

Serbuk daun *Cassia* sebanyak 50 gram dimaserasi dengan etanol 90%. Selanjutnya filtrat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* (rotavapor) pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental

### Uji Aktivitas Antimalaria :

#### *In vitro*

Pengujian aktivitas antimalaria dilakukan menurut modifikasi Budimulja, *et al* (1997). Mulanya dibuat larutan induk dalam DMSO dan dibuat serial konsentrasi dengan medium komplet ( RPMI 1640 yang diperkaya dengan 10% plasma, 25mM HEPES dan 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) sampai konsentrasi dalam sumuran menjadi 100;10; 1; 0,1 dan 0,01 µg/ml. Kultur dibuat dengan hematokrit 5% dan parasitemia sebesar 1%. Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur dipanen dan dibuat hapusan tipis dengan pewarnaan larutan Giemsa. Selanjutnya dihitung persen parasitemia dalam 5000 eritrosit dan dianalisis menggunakan analisis probit sehingga didapatkan harga IC<sub>50</sub> (Fidock *et al.*, 2004).

#### *In Vivo*

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok uji dengan suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis*. Untuk kelompok kontrol negatif diberi CMC Na 0,5% dengan pemberian satu kali sehari secara per oral. Untuk kelompok suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* diberi dosis sebesar 50, 75, 100, 150, 200 dan 250 mg/kg BB mencit dengan pemberian satu kali sehari secara per oral.

Penelitian uji aktivitas antimalaria secara *invivo* ini menggunakan modifikasi metode Peter (Philipson, 1991), *the 4-day suppressive test of blood schizontocidal*. Pengujian dilakukan dengan pemberian larutan uji selama 4 hari berturut-turut, pengujian selama 4 hari merupakan standard skrining obat antimalaria. Setiap hari diambil hapusan darah dari ekor mencit dan diberi

pewarnaan Giemsa 15%. Setelah itu dihitung dengan mikroskop per 5000 eritrosit.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji Aktivitas antimalaria *In vitro***

Hasil uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dapat dilihat pada tabel berikut ini:

**Tabel 1.** Persen pertumbuhan, Persen penghambatan dan Harga IC<sub>50</sub> ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap pertumbuhan *P. falciparum* setelah diinkubasi 48 jam

Kons (µg/mL)	R	% Parasitemia			rata-rata	% Pertumbuhan rata-rata	% Hambatan rata-rata	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
		0 jam	Rata-rata	48 jam				
Kontrol neg	1	0,38	0,41	3,78	3,77	3,36	-	12,52
	2	0,43		3,76				
100	1	0,38	0,41	0,92	0,94	0,53	84,23	
	2	0,43		0,96				
10	1	0,38	0,41	2,60	2,67	2,26	32,74	
	2	0,43		2,74				
1	1	0,38	0,41	2,86	2,89	2,48	16,19	
	2	0,43		2,92				
0,1	1	0,38	0,41	3,12	3,18	2,77	17,56	
	2	0,43		3,24				
0,01	1	0,38	0,41	3,51	3,45	3,04	9,52	
	2	0,43		3,39				

**Hasil Uji Aktivitas antimalaria *in vivo***

Hasil uji aktivitas antimalaria *in vivo* terhadap ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini:

**Tabel 2.** Tingkat parasitemia rata-rata mencit terinfeksi *P. berghei* pada pemberian suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* per oral

Kelompok dosis uji (mg bahan/kg BB mencit)	Tingkat parasitemia rata-rata (%)				
	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
K(-)	1,22	5,24	5,59	16,54	21,77
50	1,57	3,28	6,57	11,15	15,74
75	2,11	3,83	6,02	10,93	15,85
100	1,88	4,35	7,49	10,48	13,47
150	1,30	4,34	5,73	7,11	11,29
200	1,26	3,95	4,69	8,16	9,89
250	0,51	2,51	4,64	5,92	6,90

Keterangan:

D<sub>0</sub>-D<sub>4</sub> : Pengamatan persen parasitemia hari ke-0 (sebelum diberi bahan uji sampai hari ke-4 (satu hari setelah bahan uji dihentikan),

K(-) : kelompok yang diberi suspensi CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif

**Tabel 3.** Persen pertumbuhan dan penghambatan parasit pada mencit terinfeksi *P. berghei* yang diberi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* per oral

Kelompok dosis uji (mg bahan/kg BB mencit)	Pertumbuhan parasit (%)	Penghambatan parasit (%)
K (-)	20,55	-
50	14,17	31,05 ± 15,82
75	13,74	33,13 ± 17,26
100	11,59	43,60 ± 29,56
150	10,54	51,38 ± 12,58
200	8,62	58,04 ± 10,59
250	6,39	68,91 ± 8,84

Dari data yang diperoleh pada Tabel 3 diperoleh nilai ED<sub>50</sub> dengan menggunakan analisis probit sebesar 131,5 mg/kg BB mencit.

Penelitian mengenai *C. spectabilis* ini merupakan lanjutan dari hasil penelitian sebelumnya mengenai uji pendahuluan aktivitas antimalaria daun sembilan tanaman genus *Cassia* yaitu *C. moschata*, *C. javanica*, *C. grandis*, *C. spectabilis*, *C. multijuga*, *C. tora*, *C. Alata*, *C. garettiana*, dan *C. fistula* yang menggunakan ekstrak metanol (Ekasari *et al.*, 2015). Diketahui bersama untuk dapat digunakan sebagai obat tradisional, ekstrak yang digunakan haruslah berasal dari pelarut yang tergolong aman. Untuk itu pada penelitian kali ini digunakan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* yang akan diuji aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum in vitro* dan *P. berghei In vivo* dalam upaya pencarian aktivitas antimalaria tanaman ini secara menyeluruh.

Pengujian aktivitas antimalaria dalam penelitian ini dilakukan secara *in vitro* terhadap kultur *P. falciparum* strain 3D7 yang dibiakkan secara berkesinambungan dengan metode Trager dan Janssen (1976). Pengujian dilakukan dengan menambahkan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* ke dalam sumur uji yang telah berisi media lengkap. Kemudian dimasukkan suspensi parasit sebanyak 500uL. Sehingga didapatkan konsentrasi larutan uji sebesar 100 ug/mL, 10 ug/mL, 1 ug/mL, 0,1 ug/mL, 0,01 ug/mL. Setelah diinkubasi selama 48 jam, mengikuti siklus aseksual parasit, dilakukan panen dengan membuat hapusan tipis dan diwarnai dengan Giemsa (Fidock *et al.*, 2004) Hasil uji *in vitro* etanol daun *C. spectabilis* terhadap penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* didapatkan harga IC<sub>50</sub> sebesar 12,52 ug/mL.

Menurut Oliveira *et al.* (2009) ekstrak yang memiliki nilai IC<sub>50</sub> 50 terhadap *P. falciparum* dapat dilanjutkan untuk dilakukan isolasi untuk mendapatkan senyawa aktif antimalaria dari tanaman obat. Ekstrak yang menunjukkan hasil yang baik ini juga disarankan untuk dilanjutkan aktivitas antimalariannya secara *in vitro*. Dengan demikian menurut batasan tersebut, ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 12,52 ug/mL memiliki aktivitas yang tinggi sebagai antimalaria.

Selanjutnya pada ekstrak etanol daun *C. spectabilis* ini dilakukan uji aktivitas penghambatannya secara *in vivo* pada *P. berghei*. Pemilihan dosis berdasarkan pada penelitian yang dilakukan Munoz *et al.* (2000) dimana

peneliti menggunakan dosis hingga 1000 mg/kg BB mencit. Namun agar dapat memenuhi syarat sebagai antimalaria yang aktif dengan harga ED<sub>50</sub> dibawah 250 mg/kg, maka dipilih dosis dengan rentang 50-250 mg/kg BB mencit. Dari hasil penelitian terlihat rata-rata persen penghambatan terhadap *P. berghei* dari kelompok kontrol negatif dan kelompok uji, dimana semakin besar dosis uji yang diberikan, maka semakin kecil persen pertumbuhan *P. berghei*. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pula persen penghambatan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* terhadap pertumbuhan *P. berghei*. Dosis uji 250 mg/kg memberikan efek penghambatan terbesar (68,91%) dibandingkan dengan kelompok dosis uji lainnya. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* memiliki aktivitas antimalaria yang baik karena pada dosis 250 mg/kg/hari menunjukkan persen penghambatan parasit lebih besar dari 50% (Munoz *et al.*, 2000). Pustaka lainnya (Bantie *et al.*, 2014), menyebutkan bahwa ekstrak yang menghasilkan persentase penghambatan 50 % dengan uji *in vivo* pada dosis 500; 250 dan 100 mg/kgbb diklasifikasikan mempunyai aktivitas antiplasmodium sedang, baik dan sangat baik. Berdasarkan klasifikasi Bantie *et al.* (2014) maka aktivitas ekstrak etanol daun *C. spectabilis* secara *in vivo* dapat digolongkan baik karena pada dosis 150 mg/kg bb sudah dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei* 50 %. Sedangkan dengan perhitungan analisis probit didapat harga ED<sub>50</sub> dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebesar 131,5 mg/kg.

Hasil keseluruhan diatas menunjukkan bahwa ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* secara *in vitro* dan *in vivo* mempunyai aktivitas yang baik sebagai antimalaria yang dapat dijadikan obat antimalaria alternatif atau sebagai pengkombinasi dengan antimalaria lain.

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun *C. spectabilis* potensial untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka mendapatkan zat aktif antimalaria yang terkandung di dalamnya.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini bagian dalam rangkaian proyek penelitian yang didanai oleh Dirjen Pendidikan Tinggi Republik Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bantie L, Assefa S, Teklehaimanot T, Engidawork E, 2014. In vivo antimalarial activity of the crude leaf extract and solvent fractions of *Croton macrostachyus* Hocsht. (Euphorbiaceae) against *P. berghei* in mice. *BMC Complement Altern Med* 14:79
- Budimulja AS, Syaruddin, Tapchaisri P, Wilairat P, Marzuki S. 1997. The Sensitivity of Plasmodium protein synthesis to prokaryotic ribosomal inhibitors. *Mol. Biochem Parasitol* 84 (1): 137-41
- Ekasari W, Wahyuni TS, Yuistira R.A.S. 2015. Potensi antimalaria dan pemeriksaan Mikroskopik-fitokimia Genus *Cassia*. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian* Vol 2.No2. Des .
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S, 2004. Antimalarial drug discovery : Efficacy models for compound screening, Review, *Nature* 3 (Juni): 509-520.
- Kim Y, Schneider KA. 2013. Evolution of drug resistance in malaria parasite population. *Nat Educ Knowl* 4 (8):6
- Munoz V, Sauvin M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deahro E. 2000. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. *J. Ethnopharmacology* Vol 69. pp.139-155
- Oliveira AB, Dolabela MF, Braga CF, Jacome R LRP, Varotti FP, Povoia MM. 2009. Plant-Derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phytomedicines. Part I. Alkaloid. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.81 no.4 Dec.
- Phillipson, J. David, 1991. Assays for Antimalarial and Amoebicidal Activities. In: *Methods In Plant Biochemistry*, Vol. 6, pp. 135-141
- Sjafruddin D, Siregar JE, Asih PBS, 2004. Antimalarial drug resistance in Indonesia: A molecular analysis. Symposium of malaria control in Indonesia, *Proceeding*. TDC Airlangga University, Surabaya.
- Trager, W.and Jensen, J.B., 1976, Human Malaria parasites in continuous culture In: *Science*, 193, pp. 673-676.
- WHO, Malaria, Oktober 2015, [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/) Diakses 21 Desember 2015. Pukul.13.05 WIB