



Antimalarial Activity of Ethanol Extract of Sampare Leaves (*Glochidion sp var. Biak*) Against *Plasmodium falciparum* In Vitro

Khairuddin Khairuddin*, Yuri P. Utami, Muhammad A.Y. Ardi

Pharmaceutical Biology Department, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar, Indonesia

Submitted 17 September 2020; Revised 12 November 2021; Accepted 12 November 2021; Published 20 February 2023

*Corresponding author: khairuddin.elixir@gmail.com

Abstract

Malaria is one of the health problems in the world and in Indonesia. This disease is caused by the protozoan parasite, the genus *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* is the most important parasitic disease with high morbidity and mortality in the world and tropical countries such as Indonesia in particular. This study aims to determine the activity of sampare leaf extract in inhibiting the growth of the FCR-3 strain of the *P. falciparum* parasite which causes malaria. Sampare leaves were extracted by maceration method using 70% ethanol. Extract the results extraction were tested against *P. falciparum* by in vitro method. 32,67% Yield extract resulted from the extraction process. Phytochemical screening shows the presence of alkaloid compounds, flavonoids, quinones, saponins, and tannins. The ethanol extract of sampare leaves had IC_{50} antimalarial activity of 0,125 μ g/mL and was categorized very well.

Keywords: Antimalarial, *Glochidion sp var. Biak*, IC_{50} , *Plasmodium falciparum*.

Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Daun Sampare (*Glochidion sp var. Biak*) terhadap *Plasmodium falciparum* secara *In Vitro*

Abstrak

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia dan di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh parasit protozoa, yaitu genus *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* merupakan penyakit parasitik terpenting dengan morbiditas dan mortalitas tinggi di dunia dan di negara tropis seperti Indonesia pada khususnya. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas ekstrak daun sampare dalam menghambat pertumbuhan parasit *P. falciparum* strain FCR-3 yang menyebabkan penyakit malaria. Daun sampare diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak hasil ekstraksi diujikan terhadap *P. falciparum* dengan metode secara *In vitro*. Ekstrak hasil penelitian diperoleh rendemen sebesar 32,67%. Skrining fitokimia menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, kuinon, saponin dan tanin. Ekstrak etanol daun sampare memiliki aktivitas antimalaria IC_{50} sebesar 0,125 μ g/mL dan dikategorikan sangat baik.

Kata Kunci: Antimalaria, *Glochidion sp var. Biak*, IC_{50} , *Plasmodium falciparum*.

1. Pendahuluan

Penyakit malaria merupakan salah satu masalah kesehatan penting di dunia penyakit yang penularannya melalui gigitan nyamuk *anopheles* betina. Secara umum ada 4 jenis malaria, yaitu tropika, tertiana, *ovale*, dan quartana^{1,2,3}. Prevalensi malaria dari tahun ke tahun cenderung terus meningkat. Negara Indonesia merupakan salah satu negara endemik malaria di daerah Asia Tenggara selain India, Bangladesh dan Myanmar. Kementerian kesehatan menyatakan kasus malaria di Indonesia masih tinggi, tercatat jumlah penderita tahun 2018 sebanyak 46.987 kasus dan permasalahan malaria paling tinggi masih terkonsentrasi di Indonesia bagian timur³.

Malaria disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium*, salah satunya adalah *Plasmodium falciparum*. Enam spesies parasit malaria menginfeksi manusia (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium knowlesi*), pada hospes manusia, hanya sejumlah kecil dari stadium morfologi ini yang menyebabkan penyakit klinis dan sebagian besar dari semua pasien yang terinfeksi malaria di dunia menghasilkan sedikit (jika ada) gejala pada manusia^{4,5,6}. Penyakit klinis manusia (misalnya, demam, anemia, koma) merupakan respon patofisiologis manusia terhadap keberadaan parasit. Respon yang dihasilkan oleh tubuh berbeda-beda tergantung keragaman genetik parasit, koinfeksi, komorbiditas, keterlambatan dalam pengobatan, polimorfisme manusia, dan faktor lingkungan⁵. Pengobatan malaria di Indonesia sampai saat ini menggunakan kombinasi atemisinin atau ACT (*Artemisinin Combination Therapy*) dengan rata-rata sebesar 78,3%, hal ini menunjukkan bahwa resistensi masih merupakan masalah yang akan mempengaruhi keberhasilan terapi malaria⁽²⁾. Penelusuran sumber senyawa baru sangat diperlukan sebagai alternatif dalam penanganan masalah ini khususnya dari sumber bahan alam dari tumbuhan.

Tumbuhan yang berkhasiat sebagai antimalaria adalah sampare. Organisme ini

tumbuh liar di hutan hujan tropis dengan habitat tanah yang agak kering, di tanah gembur, di lahan terbuka, di ladang atau di tepi-tepi jalan. Menyebar luas di daerah tropis, banyak tumbuh di daerah Biak Papua mulai dari dataran rendah sampai ketinggian kira-kira 8-25 m dpl⁷. Secara empiris berdasarkan kearifan lokal masyarakat Biak digunakan sebagai tumbuhan obat anti malaria, cara penggunaan 2 tangkai daun sampare yang tidak terlalu tua dicuci bersih kemudian direbus dengan air. Air rebusan daun sampare diminum 2 kali sehari pagi dan sore sampai penderita malaria sembuh⁸. Beberapa tumbuhan dengan genus yang sama seperti *Glochidion ferdinandi* (Müll.Arg.) F.M. Bailey dan *Glochidion lutescens* Blume juga digunakan secara tradisional dalam pengobatan penyakit malaria⁹.

Informasi tentang tumbuhan sampare sampai saat ini masih sangat terbatas, baik penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo*. Berdasarkan uraian tersebut peneliti melakukan uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun sampare (*Glochidion sp. var. Biak*) terhadap *P. falciparum* oleh karena tumbuhan tersebut memiliki potensi yang besar untuk dieksplorasi khususnya terhadap parasit penyebab malaria dan bukti ilmiah terhadap penggunaan tanaman tersebut secara empirik sebagai terapi penyakit malaria sebagai obat tradisional.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain: alat-alat gelas, batang pengaduk, bejana maserasi, cawan porselein, mikropipet, *rotary evaporator*, timbangan analitik, *vial*, tabung *eppendorf*, *laminar air flow* (Labconco®), lemari pendingin, *candle jar*, sentrifus, tabung sentrifus, botol flacon 10 ml, labu *erlenmeyer* steril, kertas saring steril berukuran pori 0,22 µm, *slides* mikroskop, inkubator CO₂ (Napco®), *flash* kultur, *syringe* 10 mL dan 50 mL, pipet pasteur, pipet mikro 20-200 µL (Gilson®), pipet mikro 200-1000 µL (Gilson®), pipet *volume*, *blue tip* dan *yellow tip*, cawan petri, *termometer*, *plat well* 96, *cryo tube*, *bunsen*, *beaker glass* 500 ml,

counter (alat penghitung), mikroskop cahaya (Zeiss®) dan tabung reaksi.

2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: daun sampare, etanol 70%, senyawa klorokuinon sebagai senyawa standar, *parasite P. falciparum strain* FCR3, larutan penyangga HEPES, media tumbuh RPMI 1640 (*Rosewell Parla Memorial Institute*), natrium bikarbonat (NaHCO_3), hiposantin, gentamisin, aqua demineralisasi (aqua DM), larutan ACD yang dibuat dari campuran larutan RPMI dengan gentamisin, larutan RBC (*Red Blood Cell*), serum darah manusia, natrium klorida (NaCl), dimetilsulfoksida (DMSO), minyak *immerse*, dan pewarna giemsa 20%, larutan *freezing cool*, sorbitol, etanol p.a 98 %, etil asetat p.a 98%, n-heksana p.a 98%, spirtus, 28% gliserol, 3% sorbitol, 0,65% NaCl , Larutan A, B, C (NaCl 12 %, NaCl 1,6%, campuran *Dextrose* 0,2% dan NaCl 0,9%).

2.3. Prosedur

2.3.1. Penyiapan dan Pengolahan Sampel

Daun sampare didapatkan dari Biak, Provinsi Papua. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi UNM Makassar. Daun segar dipetik lalu sortasi basah, selanjutnya dilakukan pencucian untuk menghilangkan pengotor yang masih melekat pada simplisia setelah pelaksanaan sortasi basah. Selanjutnya pengeringan simplisia dilakukan dengan

cara diangin-anginkan atau tidak terkena cahaya matahari langsung pada suhu kamar. Lalu dirajang bertujuan untuk memperkecil ukuran dan memperluas permukaan simplisia agar proses ekstraksi lebih mudah dilakukan (gambar 1).

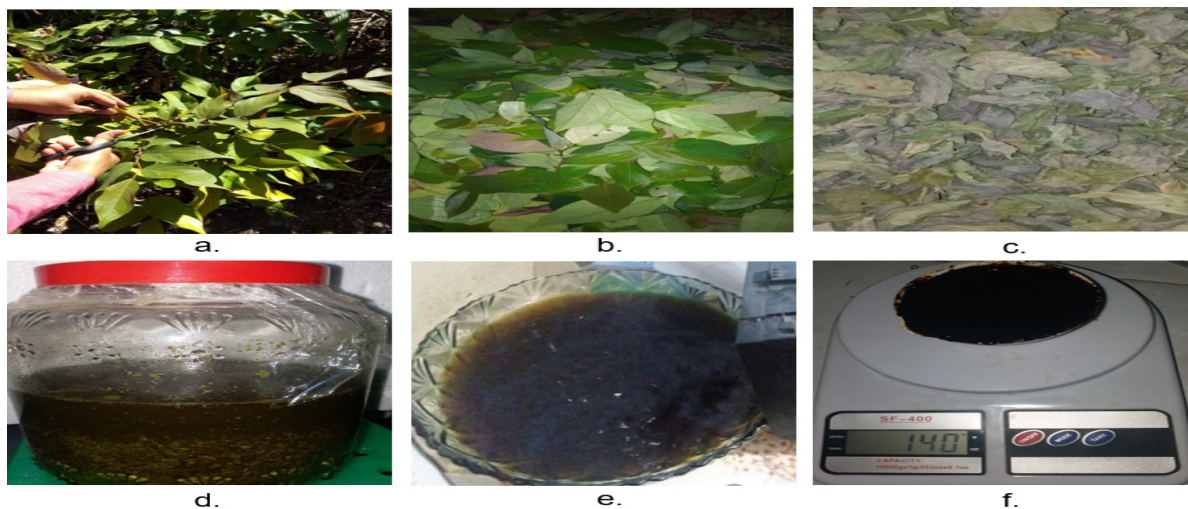
2.3.2. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sampare

Sebanyak 300 gram serbuk kering simplisia diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Dimasukkan pelarut dengan perbandingan 1:10 didiamkan selama 3-5 hari sambil diaduk sesekali. Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan kemudian disaring dan diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental¹⁰.

2.3.3. Skrining Fitokimia

Pemeriksaan Alkaloid: Sebanyak 2 gram serbuk ditambahkan dengan 5 mL ammonia 25% digerus dalam mortar, kemudian ditambahkan 20 mL kloroform, digerus kuat dan saring. Ke dalam filtrat ditambahkan asam klorida (1:10 v/v), kemudian dibagi 2, masing-masing ditambahkan pereaksi *Dragendorff* dan *Mayer*. Reaksi positif alkaloid pada penambahan pereaksi *Dragendorff* terbentuk warna jingga dan pada pereaksi *Mayer* terbentuk endapan putih¹¹.

Pemeriksaan Flavonoid: Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dalam 100 mL air panas dididihkan selama 5 menit, kemudian



Gambar 1. Proses pengolahan ekstrak etanol daun sampare : pengambilan sampel (a), sortasi basah (b), pengeringan simplisia (c), proses ekstraksi maserasi (d), penguapan filtrat hasil ekstraksi (e), dan ekstrak kental yang dihasilkan (f)

disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai larutan uji untuk penapisan senyawa golongan saponin, kuinon, dan tannin. Sebanyak 5 mL larutan uji ditambahkan serbuk magnesium dan 2 mL asam klorida-etanol (1:1), kemudian dikocok dengan 10 mL amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, kuning atau merah yang tertarik pada lapisan amil alkohol¹¹.

Pemeriksaan Saponin: Sebanyak 10 mL larutan uji dalam tabung reaksi dikocok selama 10 detik secara vertikal. Terbentuknya busa yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm yang tidak hilang dengan penambahan asam klorida, menunjukkan adanya saponin¹².

Pemeriksaan Kuinon: Ke dalam larutan uji sebanyak 5 mL ditambahkan beberapa tetes NaOH 1 N. Jika terbentuk warna merah menunjukkan adanya kuinon¹¹.

Pemeriksaan Tanin: Sebanyak 5 mL larutan uji direaksikan dengan larutan ferri (III) klorida 1 %. Terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tannin dan polifenol. Kemudian 5 mL larutan uji ditambahkan larutan gelatin, terbentuknya endapan berwarna putih menunjukkan adanya tannin¹³.

2.3.4. Uji Antimalaria Secara In Vitro

Pembuatan larutan RPMI (media kultur): *Aquadest* sebanyak 200 mL dimasukkan ke dalam gelas *beaker* kemudian ditempatkan di atas stirer. Larutan NaHCO₃, HEPES, dan RPMI ditambahkan dan diukur pH sampai 7,2 (jika pH > 7,2 maka $\pm$ HCC tetes demi tetes sampai pH 7,2). Sisa *aquadest* dituang dalam beker, distirer hingga benar-benar tercampur dan pH mencapai 7,2. Larutan RPMI disterilkan dengan filter 0,2 μ m di dalam LAF. Setiap 100 ml RPMI ditambahkan 50 ml gentamicin, kemudian disimpan di kulkas^{14,15}.

Pengambilan Darah dari Donor: Tekanan darah donor diperiksa kemudian duduk di dalam ruangan steril, di dekat LAF. Bagian yang akan diambil darahnya dengan diusap dengan kapas beralkohol, kemudian *turniquete* dipasang. Dari *wing needle*, darah

diambil dengan spuit 12 ml untuk dibuat RBC lalu dengan spuit 50 ml sebanyak 4x untuk dibuat serum. Untuk Pembuatan RBC, darah dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml yang telah diberi larutan ACD 1 ml sebagai zat antikoagulan. Alirkan darah melalui botol agar tidak berbuih. Setelah *volume* darah yang dikehendaki cukup, lepas *toniquete*, lepas *wing needle*. Bekas luka tusukan diusap dengan kapas beralkohol 70 % dan ditekan. Botol berisi darah ditutup kuat, didiamkan pada suhu ruang $\pm$ 4 jam, kemudian disimpan di kulkas.

Prosedur Pembuatan RBC (Red Blood Cell): Siapkan 2 *conical tube* 15 ml steril didalam LAF. Masukkan 1 ml larutan ACD steril ke dalam salah satu tabung. Masukkan darah dari donor ke dalam *conical tube* yang ada larutan ACD nya. Resuspensi, kemudian sentripus pada 8000 rpm selama 10 menit. Buang supernatant secara aseptis dengan pipet Pasteur ke dalam gelas beker. Ditambahkan sedikit RPMI, diresuspensi, dibagi kedalam 2 *conical tube*. Masing-masing tabung ditambah RPMI sampai 10 ml. Diresuspensi, sentrifus 8000 rpm, 10 menit. Supernatant dibuang secara aseptis dengan pipet Pasteur ke dalam gelas beker. Mengulang langkah diatas (pencucian dengan RPMI) sampai 3x pencucian. Masing-masing RBC yang diperoleh di tambah RPMI (RPMI:RBC = 1:1). Disimpan dalam lemari es.

Prosedur Pembuatan Serum: Botol berisi darah $\pm$ 200 ml didiamkan pada suhu kamar $\pm$ 4 jam, sampai terlihat 2 lapisan. Kemudian disimpan di almari es selama 24 jam. Setelah 24 jam masukkan botol ke dalam LAF, ambil serumnya secara aseptis dengan pipet Pasteur secara hati-hati. Masukkan serum ke dalam *conical tube* 15 ml secara steril. Sentrifus pada 7000 rpm, selama 10 menit. Bagian atas yang berwarna kuning (supernatant/serum) diambil dengan pipet Pasteur, masukkan dalam botol duran secara steril. Isi kembali *conical tube* dengan serum dari botol darah, lalu disentrifus, ulangi kegiatan tersebut sampai serum dari botol darah habis. Inaktivasi serum sebelum digunakan aliquot ke *conical tube* jika akan digunakan.

Prosedur Inaktivasi Serum: Nyalakan oven, set suhu 56°C. Siapkan gelas beker yang diisi dengan air sebagian, masukkan ke dalam oven. Setelah suhu oven stabil 56°C, maka perhitungan waktu dimulai. Hitung waktu sampai 1 jam. Beri label botol serum lalu simpan pada Freezer.

Prosedur Pembuatan Larutan ACD: Siapkan gelas beker diatas *stirrer*, tambah 50 mL *aquadest*, hidupkan *stirrer*. Masukkan ke dalam gelas berturut-turut : *Trisodium citrate* 2,2 g, Asam sitrat 0,8 g, *Dextrose* 2,45 g. Masukkan *aquadest* ad 100 ml, tunggu sampai semua larut, lalu matikan *stirrer*. Masukkan botol duran untuk sterilisasi

Prosedur Pembuatan Freezing Solution: Pembuatan 100 mL *Freezing solution* dengan bantuan *stirrer*. 3 g sorbitol dilarutkan dalam NaCl 0,9 % hingga volume 72 mL. Setelah semua sorbitol larut, tambahkan 28 mL gliserol. Campur hingga homogen. Dilakukan sterilisasi didalam LAF menggunakan *syringe filter* 0,22 µm. Disimpan didalam kulkas dengan suhu 4°C.

Prosedur Penyimpanan Plasmodium di Nitrogen Cair: Sebagian *plasmodium* dipindahkan dari *flask kultur* ke *conical tube* dengan pipet Pasteur secara aseptis. Disentrifus pada 7000 rpm, selama 10 menit. Supernatant dibuang (diambil secara aseptis dengan pipet Pasteur, pipet Pasteur yang sama dapat digunakan untuk mengambil supernatant pada *conical tube* yang lain, jika plasmonya ada 2 *conical tube*). Ditambahkan *freezing solution* :endapan (1:1). Diresuspensi dengan pipet Pasteur. Suspensi *plasmodium* dipindahkan ke *cryotube* (1,8 mL) dengan volume maksimal 1,5 mL atau diisi ½ *cryotube* (*cryotube* tidak boleh dipegang pada saat *suspense plasmodium* dimasukkan, tetapi diletakkan di atas meja LAF, dekat Bunsen). *cryotube* ditutup dan tutupnya dilewatkan diatas api Bunsen. *cryotube* ditutup, di labeli. Segera disimpan dalam tabung N₂ di laboratorium parasitologi.

Prosedur Thawing: Siapkan alat dan bahan didalam LAF, ambil *plasmodium* dari tabung N₂ cair di laboratorium parasitologi FK UGM. *Plasmodium* dalam *cryotube* segera dihangatkan dengan cara *Plasmodium*

dipindahkan ke dalam *conical tube* 15 mL. Ke dalam *conical tube* ditambah Larutan A 200 µL tetes demi tetes lalu tunggu 2 menit. Kemudian ditambah Larutan B sebanyak 10 mL tetes demi tetes, disentrifus 4000 rpm selama 10 menit. Supernatant dibuang dengan pipet pasteur secara aseptis. Ditambah larutan C sebanyak 10 mL tetes demi tetes, disentrifus 4000 rpm, selama 10 menit. Supernatant dibuang dengan pipet Pasteur secara aseptis. Endapan : diambil untuk dibuat apusan tipis, masukkan endapan ke *flask kultur*, ditambah RPMI 9 mL, ditambah RBC 50 µL, ditambah HS 1,3 mL, diinkubasi selama 48 jam dalam *candle jar* dalam inkubator CO₂ 5 %, suhu 37,5°C.

Prosedur Thawing yang Baru: *Plasmodium* simpanan (*cryo*) diambil dari tabung N₂ cair di laboratorium parasitology. Segera dihangatkan dengan bantuan waterbath suhu 37,5°C digoyang-goyang di air saja. *Plasmodium* dipindah ke *conical tube* 15 mL dengan *Blue Tip* (diambil pelan-pelan). Ditambah NaCl 3,5 % (1:1) teteskan pelan-pelan melalui dinding sambil digoyang-goyang. Ditambah RPMI sampai 10 ml. Resuspensi. Sentrifus 10 menit, 7000 rpm. Buang supernatant dengan pipet Pasteur. Endapan:diambil sedikit untuk dibuat preparat apusan, dipindahkan ke *flask kultur*, ditambah RPMI 8 mL, HS 2 mL, RBC 200 µL. Diinkubasi selama 48 jam dalam *candle jar*.

Prosedur Ganti Media dan Perhitungan Parasitemia: Kultur di *candle jar* dikeluarkan dari inkubator ke LAF. Keluarkan *flask kultur* secara perlahan (Jangan sampai tercampur). Buang media secara perlahan dengan pipet Pasteur usahakan jangan terambil RBC nya. Setelah sudah terbuang semua masukkan media yang dibutuhkan. Tambahkan RPMI 8 mL, HS 500 µL, RBC 200 µL (Kondisi *plasmodium* dalam keadaan normal, jika pertumbuhan kurang bagus bisa ditambah serum. Tutup *Flask kultur*, masukkan kembali ke *candle jar*, *flask* tidak ditutup rapat, supaya udara bisa masuk kedalam *flask*. Masukkan lilin yang nyala sampai dibiarkan mati. Masukkan inkubator.

Perhitungan Parasitemia Sampai

Pembuatan Preparat Apusan tipis: Endapan *plasmodium* dimasukkan ke dalam mikrotube. Disentrifus 7000 rpm $\pm$ 101. Supernatant dibuang sampai difiksasi (dikeringkan) dengan metanol p.a. Tetesi dengan cat Giemsa 10% (*fresh*) tunggu selama 10 menit. Dicuci dibawah air mengalir lalu dikeringkan dengan *hair dryer*. Untuk dilakukan pengamatan kemudian ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop perbesaran 100x. Pengamatan dilakukan dengan menghitung setiap 1000 sel darah ditemukan berapa sel *plasmodium* yang menginfeksi¹⁶.

$$\frac{\text{sel plasmio yang ditemukan}}{\text{sel RBC yang ditemukan}} \times 100 = \text{persentase parasitemia}$$

Metode Sinkronisasi: Kultur *plasmodium* dimasukkan ke *conical tube* 15 mL steril dengan pipet Pasteur. Sentrifus pada 7000 rpm selama 10 menit. Buang supernatant dengan pipet Pasteur. Endapan *plasmodium* ditambah sorbitol 5% tetes demi tetes, lalu diresuspensi (setiap 1 mL endapan ditambah 5 mL sorbitol 5%). Masukkan ke inkubator CO₂ selama 10 menit. Sentrifus pada 7000 rpm selama 10 menit. Buang supernatant. Endapan ditambah 5 mL RPMI, ditambah 250 μ L HS (fungsinya untuk pencucian. Diresuspensi: Disentrifus selama 10 menit, bagian supernatant dibuang dan endapan dipakai untuk uji atau dikultur kembali, kemudian ditambah 8 ml RPMI, 500 μ L HS, RBC tidak perlu ditambahkan. Ambil sedikit untuk dibuat apusan, masukkan ke dalam tabung EPP, sentrifus 10 menit, dibuat apusan.

Pengumpulan Data dan Analisis Data: Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi dari senyawa yang menghasilkan penghambatan 50% dibandingkan secara relatif terhadap kontrol yang tidak diberi perlakuan. Persen pertumbuhan didapatkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut¹⁷.

$$\% \text{ pertumbuhan} = \% \text{ parasitemia} - \text{DO}$$

Keterangan:

DO = % pertumbuhan pada jam ke-0

Persentase penghambatan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - \left[\left(\frac{X_u}{X_k} \right) \times 100\% \right]$$

Keterangan :

Xu = % pertumbuhan pada larutan uji

Xk = % pertumbuhan pada kontrol negatif

Berdasarkan data persen penghambatan dilakukan analisis antara konsentrasi uji terhadap persen penghambatan dengan menggunakan analisis probit log untuk mengetahui nilai atau konsentrasi uji yang dapat menghambat pertumbuhan parasit sebanyak 50%.

3. Hasil

Tahap awal dilakukan pengambilan sampel berupa daun sampare. Daun sampare segar diambil sebanyak 1,4 kg. Didapatkan simplisia kering sebesar 300 mg, kemudian diekstraksi. Ekstrak yang didapatkan sebanyak 80 g. Persen randemen yang diperoleh sebesar 26,67 %.

4. Pembahasan

Determinasi terhadap sampel sampare dilakukan untuk memastikan identitas dari tanaman tersebut, berdasarkan hasil penelusuran yang dilakukan oleh Skrining fitokimia dilakukan bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol daun sampare. Hasil uji skrining fitokimia pada tabel 1 dan gambar 2 dilakukan uji alkaloid dengan menggunakan 3 reagen pereaksi, yaitu: reagen Mayer, reagen *Wagner*, dan reagen *Dragendorff*. Terbentuknya endapan pada uji *Mayer* dan *Dragendorff* berarti dalam ekstrak etanol daun sampare terdapat alkaloid. Hasil positif alkaloid pada uji *Mayer* ditandai dengan terbentuknya endapan putih dan terbentuknya endapan jingga pada ekstrak dengan pereaksi *Dragendorff*. Terjadinya endapan dikarenakan oleh atom nitrogen dalam alkaloid memiliki elektron bebas yang dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi tersebut. Pereaksi *Dragendorff* mengandung kalium iodida dan bismuth subnitrat. Sedangkan pereaksi *Mayer* mengandung merkuri klorida dan kalium iodida¹⁸.

Kuinon yang terdapat pada senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antimalaria. Salah satu derivat dari kuinon yang sudah teruji dan berpotensi



Gambar 2. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun sampare : alkaloid (a,b, dan c), flavonoid (d), kuinon (e), saponin (f), dan tanin (g)

membunuh *P. falciparum* adalah *Atovaquone*. *Atovaquone* termasuk dalam golongan obat *naphthoquinone* dan digunakan dalam kombinasi dengan proguanil (*Malarone*) untuk pengobatan malaria akut tanpa komplikasi yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* (termasuk *P. falciparum*/*P. vivax* yang resisten klorokuin). Banyak senyawa turunan kuinon memiliki menarik banyak perhatian dalam beberapa dekade terakhir karena potensinya dalam penemuan obat antimalaria (naphtho-/benzoquinone, *anthraquinones*, *thiazinoquinones*¹⁹.

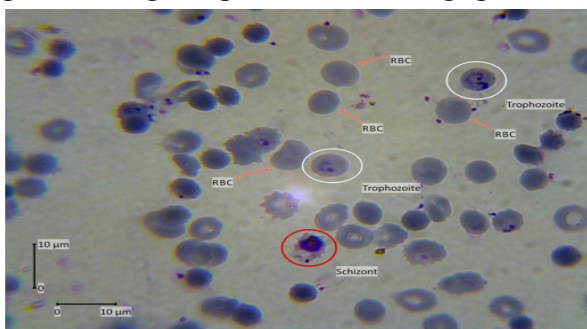
Flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna merah yang tertarik ke atas pada penambahan amil alkohol. Perubahan warna larutan disebabkan oleh tereduksinya senyawa flavonoid oleh penambahan serbuk Magnesium dan asam klorida. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol yang memiliki sifat menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur¹⁸.

Saponin ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1 cm yang tidak hilang dengan penambahan HCl. Busa yang terbentuk disebabkan oleh adanya gugus polar glikosil dan gugus non polar terpenoid/steroid yang bersifat aktif sehingga ketika dikocok saponin membentuk misel. Pada struktur misel, gugus polar menghadap ke luar dan gugus non

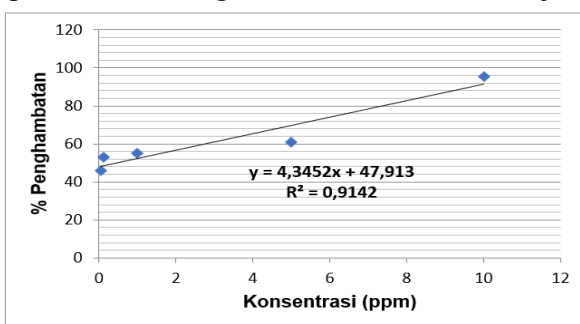
polar menghadap ke dalam, keadaan inilah yang terlihat seperti busa. Tanin ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi hijau kehitaman. Perubahan warna ini disebabkan oleh bereaksinya gugus hidroksil pada tanin dengan larutan FeCl_3 ¹¹. Hasil skrining fitokimia selengkapnya dapat dilihat pada tabel 1.

Uji Aktivitas Anti Malaria Ekstrak Daun Sampare: Aktivitas antimalaria dinyatakan dengan IC_{50} , yaitu kadar senyawa uji yang mampu menghambat pertumbuhan parasit sampai 50%. Pertumbuhan parasit plasmodium dalam darah menjadi indikator penilaian dalam menilai aktivitas antimalaria secara *in vitro* (gambar 3). Pertumbuhan parasit setelah perlakuan dengan berbagai seri kadar disajikan pada tabel 1 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit semakin berkurang. Parasetamia tertinggi terlihat pada kontrol negatif (kelompok tanpa perlakuan senyawa uji). Hasil ini membuktikan bahwa terdapat efek farmakologis berupa penghambatan *Plasmodium* akibat pemberian ekstrak dari daun sampare.

Persentase penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* strain FCR-3 *in vitro* setelah pemberian ketiga ekstrak selama 72 jam



Gambar 3. Pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* pada sel darah merah.



Gambar 4. Grafik regresi linear uji aktivitas antimalaria

Tabel 1. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Sampare

No	Uji Senyawa	Pereaksi	Hasil (+)	Hasil (Warna / Endapan)	Kesimpulan
1	Alkaloid	Mayer	Endapan putih	Endapan cokelat	-
		Wagner	Endapan cokelat	Endapan cokelat	+
		Dragendorff	Warna jingga	Warna jingga	+
2	Kuinon	5 mL larutan uji + beberapa tetes NaOH 1N	Merah	Merah	+
3	Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat + amil alkohol	Merah	Merah	+
4	Tanin	+ 10 mL aquades + FeCl ₃ 1%	Hiaju kehitaman	Hijau Kehitaman	+
5	Saponin	Air Panas, dikocok kuat 10 detik + HCl 2N	Buih tidak hilang selama 5 menit	Buih tidak hilang	+

dihitung berdasarkan rerata nilai persentase pertumbuhan hasil uji aktivitas antimalaria pada tabel 2 dan gambar 4. Aktivitas *antiplasmodium in vitro* selanjutnya dikaji dengan menetapkan nilai IC₅₀ melalui analisis probit dalam program Excel berdasarkan nilai rerata % penghambatan dengan log kadar ekstrak uji. Ekstrak etanol daun sampare sangat potensional berdasarkan nilai IC₅₀.

Struktur kimia flavonoid berbeda dengan obat-obat antimalaria yang ada saat ini, seperti alkaloid, seskuiterpen lakton dan golongan sulfa. Obat-obat dengan struktur kimia yang berbeda, sangat mungkin memiliki mekanisme kerja yang berbeda. Dengan mekanisme kerja yang berbeda diharapkan tidak terjadi resistensi silang. Ada beberapa kemungkinan mekanisme kerja flavonoid terhadap parasit malaria. Kemungkinan-kemungkinan mekanisme kerja ini ada yang memiliki target di vakuola makanan, yang lainnya di luar vakuola makanan. Khalkon, suatu senyawa flavonoid minor telah diketahui memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan parasit melalui mekanisme

penghambatan enzim sistein protease pada parasit. Hambatan terhadap sistein protease ini dapat menyebabkan terhambatnya proses hidrolisis hemoglobin menjadi asam amino yang dibutuhkan parasit. Dengan demikian sintesis protein parasit juga akan terhambat²⁰.

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol dari daun sampare memiliki kemampuan menghambat *Plasmodium falciparum* dengan IC₅₀ sebesar 0.125 µg/ml.
2. Skrining fitokimia menunjukkan ekstrak daun Sampare mengandung golongan senyawa metabolit sekunder yaitu Alkaloid, Kuinon, Flavonoid, Saponin dan Tanin.

Daftar Pustaka

1. WHO. World Malaria Report 2020. 2020;1-250. Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria->

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Daun Sampare

Kelompok Uji	Parasitemia					Persentase Penghambatan (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
	1	2	3	Rerata	SD		
Kontrol negatif	1.8	2.6	2.4	2.26	0.41	-	0.125
10	0	0	0.30	0.10	0.17	95.58	
5	0.70	0.80	1.17	0.89	0.25	60.62	
1	1.30	1.06	0.70	1.02	0.30	54.87	
0.1	1.10	1	1.10	1.07	0.06	52.80	
0.05	1.19	1.37	1.11	1.22	0.13	45.87	

- report-2020
2. Kementrian Kesehatan RI. Buku Saku Tatalaksanaan Malaria 2019. 2019;1–44.
 3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Vol. 1, Kementerian Kesehatan RI. 2019. Available from: <https://www.kemkes.go.id/article/view/19093000001/penyakit-jantung-penyebab-kematian-terbanyak-ke-2-di-indonesia.html>
 4. Moxon CA, Gibbins MP, McGuinness D, Milner DA, Marti M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2020;15:315–343.
 5. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1):1–11.
 6. del Prado GRL, García CH, Cea LM, Espinilla VF, Moreno MFM, Márquez AD, et al. Malaria in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(1):1–4.
 7. Dinas Kesehatan Papua. Tumbuhan Obat Tradisional Papua Berdasarkan Kearifan Lokal Masyarakat. Nulisbuku Jendela Dunia; 2016. p. 58–59
 8. Oktalia G, Chrystomo LY, Karim AK. Uji Aktivitas Sitotoksik dan Analisis Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Sampare (*Glochidion* sp.). *J Biol Papua.* 2018;9(2):49–54.
 9. Budiarti M, Maruzy A, Mujahid R, Sari AN, Jokopriyambodo W, Widayat T, et al. The use of antimalarial plants as traditional treatment in Papua Island, Indonesia. *Heliyon.* 2020;6(12):e05562.
 10. Moyo P, Kunyane P, Selepe MA, Eloff JN, Niemand J, Louw AI, et al. Bioassay-guided isolation and identification of gametocytocidal compounds from *Artemisia afra* (Asteraceae). *Malar J.* 2019;18(1):1–11.
 11. Pandey A, Tripathi S, Pandey CA. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem JPP.* 2014;115(25):115–9.
 12. Portet B, Fabre N, Roumy V, Gornitzka H, Bourdy G, Chevalley S, et al. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry.* 2007;68(9):1312–20.
 13. Fenta M, Kahaliw W. Evaluation of antimalarial activity of hydromethanolic crude extract and solvent fractions of the leaves of *Nuxia congesta* R. Br. Ex fresen (Buddlejaceae) in *Plasmodium berghei* infected mice. *J Exp Pharmacol.* 2019;11:121–34.
 14. Budiarti M, Jokopriyambodo W. Potensi Ekstrak Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita*) Sebagai Anti *Plasmodium falciparum*. *Bul Penelit Tanam Rempah dan Obat.* 2020;31(2):85.
 15. Tiko GH, Medjigbodo A, Adamou R, Amoussa Amo, Djogbenou LS, Lagnika L. Scientific Baseline Information for the Potential Use of *Hibiscus surattensis* L against Malaria: Phytochemistry and Biological Studies. *J Drug Deliv Ther.* 2020;10(5):127–35.
 16. Sahoo RK, Tamuli KJ, Lhouvum N, Dutta D, Bordoloi M, Sharma HK, et al. Phytochemical constituents from *Xanthium strumarium* L. and evaluation of their in vitro antimalarial activities. *South African J Bot.* 2020;135:35–40.
 17. Ezenyi IC, Salawu OA, Kulkarni R, Emeje M. Antiplasmodial activity-aided isolation and identification of quercetin-4'-methyl ether in *Chromolaena odorata* leaf fraction with high activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 2014;113(12):4415–22.
 18. Parbuntari H, Prestica Y, Gunawan R, Nurman MN, Adella F. Preliminary Phytochemical Screening (Qualitative Analysis) of Cacao Leaves (*Theobroma cacao* L.). *Eksakta Berk Ilm Bid MIPA.* 2018;19(2):40–5.
 19. Patel OPS, Beteck RM, Legoabe LJ. Antimalarial application of quinones: A recent update. *Eur J Med Chem.* 2021;210:113084.
 20. Kumar, D., Kumar, M., Kumar, A., & Kumar Singh, S. Chalcone and curcumin derivatives: a way ahead for malarial treatment. *Mini reviews in medicinal chemistry,* 2013;13(14):2116-2133.