

ISBN 978-602-8547-80-2



PROCEEDINGS



SEMINAR NASIONAL SAINS DAN TEKNIK (SAINSTEK)

KUPANG, 13 NOVEMBER 2012

Bidang Sains



Bidang Teknik



Penerbit UNDANA PRESS

Diselenggarakan Oleh:
Fakultas Sains dan Teknik
UNIVERSITAS NUSA CENDANA

SUSUNAN PANITIA

Pelindung : Rektor Undana
Penasehat : Pembantu Rektor II
Penanggung Jawab : Dekan Fakultas Sains dan Teknik
Wakil Penanggung Jawab :

1. Pembantu Dekan I
2. Pembantu Dekan II
3. Pembantu Dekan III

Ketua : Dr. Drs. Frans Kia Duan, M.Si
Wakil Ketua : Dr. Drs. Ruslan, ST, MT

Sekretaris : Silvester Tena, ST, MT
Wakil Sekretaris : Drs. Djefry Amalo, M.Pd

Tim Pengarah Nasional:

1. Prof. Dr. Ir. H. Salama Manjang, MT (Teknik Elektro: UNHAS)
2. Prof. Ir. Jamasri, Ph.D (Teknik Mesin : UGM)
3. Prof. Ir. Iswandi Imran, Ph.D (Teknik Sipil: ITB)
4. Dr. Agung Nurlindo (Teknik Pertambangan: ITB)
5. Dr. Herry Z. Kotta, MT (Teknik Pertambangan: UNDANA)
6. Prof. Mangadas L. Gaol, M.Si, Ph.D (Sains: UNDANA)
7. Prof. Dr. Mudasir, M.Eng. (UGM)
8. Yohanes Buang, Ph.D (UNDANA)
9. Prof. Dr. Kamsul Abraha, Ph.D (UGM)
10. Prof. Dr. H. Muslimin Ibrahim, M.Pd (Pendidikan Sains dan Teknik: UNESA)
11. Prof. Dr. Ir. Yohanes Hutabarat, M.Sc (UNDIP)
12. Prof. Dr. Tati Suryati Syamsudin, MS, DEA (ITB)
13. Dr. Bambang Kiranadi (IPB)
14. Prof. Ir. Frans Umbu Datta, MApp.Sc, Ph. D (UNDANA)
15. Prof. Dr. Asep K. Supriatna (UNPAD)

Seksi-Seksi

A. Seksi Kesekretariatan :

1. Ali Warsito, S.Si, M.Si (Ketua)
2. Rifat Y. Maromon, ST
3. Adriana Fanggihade, SKom, M.CS
4. Woro Sundari, ST, MT
5. Ariyanto, S.Si, M.Si
6. Pius D. Olla, S.Si, M.Si
7. S. Y. Dillak
8. Oscar Y. Naben, ST
9. Don E.G.D. Pollo, ST, MT

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	ii
Sambutan Ketua Panitia Seminar	iii
Sambutan Dekan FST Universitas Nusa Cendana	iv
Susunan Panitia	v
Informasi Seminar	vii
Jadwal Presentase	viii
Daftar Isi	xiv

No.	BAGIAN 1: BIDANG SAINS	Hal
1.	Pemanfaatan Abu Sekam Padi Sebagai Sumber Silika untuk Sintesis Zeolit <i>Pius D. Ola, Kornelia Ruku, Hermania Em Wogo</i>	S1-S6
2.	Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kayu Ular (<i>Strychnos Ligustrina</i>) pada Mencit yang Terinfeksi <i>Plasmodium Berghei</i> <i>Maximus M. Taek</i>	S7-S10
3.	Investigasi Pergerakan Tanah Berbasis Pola Kecepatan Tanah Maksimum (PGV) Akibat Gempa Bumi untuk Identifikasi Stabilitas Wilayah sebagai Salah Satu Acuan Pembangunan Infrastruktur <i>Lantu, Dewi Ika Kartika, Sabrianto Aswad, dan Muh.Imran Tahir</i>	S11-S14
4.	Potency of Methanol Extract of <i>Artocarpus Champeden</i> Stem Bark to Inhibits the Chloroquine Sensitive and Chloroquine Resistant Strains of <i>Plasmodium Falciparum</i> In-Vitro <i>Maximus M. Taek, Aty Widyawaruyanti, Maria Nindatu</i>	S15-S19
5	Sintesis dan Karakterisasi Kompleks Diorganotimah (IV) Dikarboksilat : Bis(μ 2 Piridin-2,6-Dikarboksilat) Bis[Hidroksodimetiltimah(IV)] <i>Immanuel Gauru</i>	S20-S23
6	Rancang Bangun Struktur Jaringan Syaraf Tiruan Untuk Optimasi Prediksi Curah Hujan Bulanan <i>Magfira Syarifuddin</i>	S24-S29
7	Penentuan Efisiensi Prototipe Sel Surya Organik Berbasis Senyawa Kompleks Kardanol Asal Alor Menggunakan 3,4,9,10-Perylene Tetra Carboxylic Dianhydride (PTCDA) sebagai Donor dengan Elektroda Emas <i>Zakarias Seba Ngara, Igusti Budiana, Aliwarsito, Kristina Naiaki, Yanti Toeslaka</i>	S30-S35
8	Identifikasi Komposisi Biodiesel Hasil Transesterifikasi Minyak Biji Bunga Matahari (<i>Helianthus Annus L.</i>) Asal Pulau Timor pada Berbagai Rasio Molar Metanol Minyak <i>Bibiana Dho Tawa, Febri Odel Nitbani, Yurlens A. Teramahi</i>	S36-S41
9	Penerapan Metode Full Close Loop pada Rancang Bangun Sistem Pengontrolan Ketinggian Permukaan Air secara Otomatis Menggunakan Mikrokontroler AT89C51 <i>Cristhin J Seubelan, Ali Warsito, Jehunias L Tanesib,</i>	S42-S46
10	Pemanfaatan Pasir Besi Teraktivasi Asam untuk Menurunkan Kadar Ca(II) dalam Air <i>Hermania Em Wogo, Suwari, dan Yoseph Jeksintus Hema</i>	S47-S54
11	The Bacteriostatic and Bacterisidal Effect of Extract of <i>Andrographis Paniculata</i> Nees in <i>Rattus Norwegicus</i> Serum on <i>Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus</i> (MRSA) in Vitro <i>Abdul Majid</i>	S55-S59
12	Interpretasi Bawah Permukaan Pulau Sumba dan Sekitarnya dengan Pemodelan 2D berdasarkan Data Anomali Gravitasi <i>Christine Mbiliyora, Jehunias L. Tanesib, Bernandus</i>	S60-S64
13	Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik dari Berbagai Kawasan Hutan di Pulau Timor <i>Lawa Yosep, Airtur Moresi dan Sole Robert</i>	S65-S69
14	Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Produksi Metil Ester Asam Lemak dari Minyak Biji Bunga Matahari (<i>Helianthus annuus L.</i>) Asal Pulau Timor melalui Reaksi Transesterifikasi <i>Febri Odel Nitbani, Bibiana Dho Tawa, Agustina M. Roma</i>	S70-S74

AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK KAYU ULAR (*Strychnos Ligustrina*) PADA MENCIT YANG TERINFEKSI *PLASMODIUM BERGHEI*

Maximus M. Taek

Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Katolik Widya Mandira

Jln. Jenderal. Achmad Yani No. 50-52 Kupang 85225

E-mail: maximusmt2012@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi antimalariadari ekstrak kayu *Strychnos Ligustrina* (Kayu Ular) yang merupakan obat tradisional antimalarial yang terkenal di Timor-Nusa Tenggara Timur (NTT). Kayu batang *S. ligustrina* dimaserasi dengan pelarut tunggal etanol. Ekstrak etanol yang diperoleh diuji daya hambatnya terhadap pertumbuhan *Plasmodium Berghei* Strain ANKA yang diinfeksi pada mencit jantan strain Balb/C berumur 2 bulan dengan berat badan (BB) 20-25 gram.

Pengujian dilakukan dengan enam macam dosis ekstrak yakni 20; 2,0; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/kg BB mencit, yang diberikan secara intraperitoneal. Sebagai kontrol positif digunakan klorokuindifosfat dengan dosis 1,0 mg/kg BB, dan kontrol negatif digunakan DMSO. Pengujian dilakukan menurut prosedur Peter Test (the 4-days suppressive test of blood schizontocidal action). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu *S. ligustrina* menghambat pertumbuhan *P. Berghei* secara in-vivo dengan nilai IC_{50} 0,128 mg/kg BB mencit (0,209-0,703 mg/kg BB).

Kata Kunci: *Strychnos Ligustrina*, Aktivitas Antimalaria, *Plasmodium Berghei*, Peter Test, In-vivo.

1. PENDAHULUAN

Usaha penanggulangan penyakit malaria telah banyak dilakukan, baik melalui pemberantasan terhadap vektornya (*Anopheles sp.*) dengan berbagai obat anti serangga, maupun pemberantasan terhadap parasitnya (*Plasmodium sp.*) dengan obat-obat antimalaria, baik sintesis maupun yang berasal dari bahan alam. Tetapi bahaya resistensi dan efek samping yang ditimbulkan oleh obat-obatan tersebut tidak dapat dihindarkan. Tingkat resistensi yang tinggi dari *P. falciparum* terhadap obat-obatan antimalariayang ada sekarang ini sangat mengkhawatirkan. *P. falciparum* yang resisten telah ditemukan di seluruh bagian negara tropis di dunia (WHO, 2001). Di Indonesia, *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin telah ditemukan di seluruh provinsi, dan di 11 provinsi di antaranya ternyata telah resisten *multidrug* [Tjitra, 2004]. Kenyataan resistensi seperti dikemukakan di atas kemudian mendorong berbagai upaya pencarian senyawa baru sebagai obat antimalaria baik dari bahan alam maupun hasil sintesis.

Penelitian untuk memperoleh senyawa-senyawa obat antimalariadari bahan alam sampai saat ini gencar dilakukan dan semakin meluas, mencakup sebagian besar wilayah dan bermacam-macam spesies tumbuhan di seluruh dunia. Banyak senyawa dari berbagai tumbuhan telah diisolasi dan diketahui memiliki aktivitas antimalaria berdasarkan pengujian secara *in-vitro* dan *in-vivo*. Kebanyakan tumbuhan yang menjadi sumber senyawa aktif tersebut adalah tumbuh-tumbuhan yang secara tradisional memang sudah dimanfaatkan masyarakat setempat sebagai obat

tradisional untuk mengobati penyakit malaria [Schwikkard and Van Heerden, 2002; Saxena, S., et al., 2003].

Masyarakat tradisional Indonesia sejak dahulu telah mengenal dan memanfaatkan beberapa tumbuhan sebagai bahan obat antimalaria, antara lain sambiloto (*Andrographis Paniculata*), daun nimba (*Azadirachta Indica*), johar (*Cassia Siamea*), pule (*Alstonia Scholaris*), melati gambir (*Jasminum Quenquenerium*), mahoni (*Swietenia Macrophylla*), meniran (*Phyllanthus Niruri*), cempedak (*Artocarpus Champeden*), dan lain-lain [Masroerah dan Sutaryo, 1994; Heyne, 1987; Depkes RI, 1989; Mulyaningsih, 1995; Iwasaki and Ogata, 1995]. Di Pulau Timor, NTT, masyarakat mengenal salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat antimalaria adalah kayu ular (*Strychnos Ligustrina*) dari genus *Strychnos*. Tumbuhan ini sudah sedemikian terkenalnya sebagai obat antimalaria di kalangan masyarakat Timor, dan di beberapa wilayah lain di NTT seperti Flores dan Lembata [Maximus dan Gerardus, 2008]. Di daerah lain di Indonesia, *S. ligustrina* dikenal dengan nama bidara laut, bidara pahit, bidara putih, kayu ular (Sumatra); dara laut, dara putih, bidara ghuong (Jawa); ai betek, ai hedu, hau feta, maba putih, songga, elu, ai baku moruk (Nusa Tenggara); aju mapai, bidara mapai (Depkes RI., 1989).

Beberapa tumbuhan anggota genus *Strychnos* seperti *S. usamberensis*, *S. variabilis*, *S. myrtoides* dan *S. icaja* yang tumbuh di Afrika telah diuji aktivitasnya sebagai antimalaria secara *in-vitro* dan diketahui berpotensi sebagai antimalaria. Dari

beberapa tumbuhan tersebut telah pula diisolasi beberapa senyawa *alkaloid* yang aktif antimalarial seperti *dihydrousambarensine*, *usamberensine*, *strychnopentamine* dan *isostrychnopentamine* [Saxena, et al., 2003; Frederich et al., 2000; Frederich et al., 2001].

Walaupun beberapa anggota genus *Strychnos* sudah diteliti potensinya sebagai antimalaria, namun penelitian dan publikasi mengenai pemanfaatan dan khasiat antimalarial dari tumbuhan kayu ular asal Timor (*Strychnos Ligustrina*), sejauh ini sulit ditelusuri, dan mungkin memang belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari ekstrak etanol kayu ular pada mencit yang terinfeksi *P. Berghei* melalui pengujian untuk menentukan harga IC_{50} secara *in-vivo*. Selain itu, penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia (jenis/golongan senyawa) yang terkandung di dalam ekstrak kayu ular melalui cara skrining fitokimia.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

- **Simplicia:** kayu *S. Ligustrina*, diambil dari hutan Camplong, Kecamatan Fatuleu, Kabupaten Kupang, Timor, NTT.
- **Hewan coba:** mencit jantan galur Balb/C dengan berat badan 20–30 gram dan umur ± 2 bulan.
- **Parasit uji:** *P. Berghei* Strain ANKA yang diperoleh dari Tropical Diseases Centre (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.
- **Bahan pembanding:** kontrol positif klorokuindifosfat, dan kontrol negatifnya adalah DMSO.
- **Bahan uji in-vivo:** DMSO, *medium alseiver*, pewarna *giemsa*, *aquadest* dan minyak imersi.
- **Bahan kimia:** etanol, metanol, kloroform, heksana, etilasetat, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi *serisulfat*, dan pereaksi *anisaldehid-asam sulfat*, plate KLT Kiesel Gel 60 GF₂₅₄.
- **Alat-Alat:** rotavapor, penyaring Buchner, mikropipet, lampu UV 254 dan 365 nm, *erlenmeyer*, gelas ukur, vial, bak kromatografi, neraca analitik, mikroskop, object glass, pipet, petri-dish, spat dan jarum suntik.

2.2 Cara Kerja

Pembuatan Ekstrak dan Telaah Fitokimia

Kayu dipisahkan dari kulitnya lalu diserut kemudian digiling menjadi serbuk. Serbuk kayu ular dimaserasi dengan etanol 96% selama 3x24 jam, lalu ekstraknya diuapkan sampai kering menggunakan rotavapor. Terhadap ekstrak kayu ular di atas lalu diidentifikasi kandungan senyawa

golongan *alkaloid*, *terpenoid*, *saponin* dan *flavonoid*, berdasarkan prosedur identifikasi standard [Hefman, 1975; Harborne, 1987; Markham, 1988; Gritter, 1991].

Pembiakan *P. Berghei* pada Mencit Donor

Stok darah dari simpanan beku berisi *plasmodium* di-thawing pada suhu 37°C lalu diinjeksikan pada mencit donor dengan volume 0,1–0,2 ml. Setiap hari diambil sedikit darah dari ekor mencit, dibuat hapusan tipis di atas *object glass*, difiksasi dengan metanol, dan diwarnai dengan *Giemsa*, kemudian dilakukan pemeriksaan tingkat *parasitemia* dari mencit donor. Setelah tingkat *parasitemia* mencapai $\pm 20\%$, dilakukan pembedahan mencit donor dan diambil darahnya untuk diinfeksi pada mencit uji secara *intraperitoneal*. Tingkat *parasitemia* mencit diamati setiap hari melalui pembuatan hapusan darah. Uji aktivitas antimalaria dilaksanakan setelah *parasitemia* sudah mencapai 1–5%.

Uji Aktivitas Antimalaria

Digunakan metode modifikasi *Test Peter* (*The 4-days suppressive test of blood schizontocidal action*; LUMC, 2002). Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol kayu batang *S. Ligustrina* dibuat dalam 6 (enam) macam dosis yakni: 20; 2,0; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/kg BB mencit dalam DMSO. Setiap kelompok uji diberikan larutan ekstrak secara *intra peritoneal* sebanyak 0,25 ml. Pemberian bahan uji ini dilakukan selama 5 hari (D0–D4), dan setelah itu tidak diberikan lagi sampai hari ketujuh (D6). Kelompok kontrol positif diberikan 0,25 ml larutan klorokuindifosfat dengan dosis 10 mg/kg BB, sedangkan kontrol negatif mendapat 0,25 ml DMSO.

2.3 Evaluasi Hasil Uji Antimalaria

Setiap hari dilakukan pengambilan sedikit darah dari ekor masing-masing mencit untuk dibuat hapusan darah tipis. Hapusan dibuat di atas *glass object*, difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan *Giemsa*, selanjutnya dibaca di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali untuk menghitung jumlah parasitnya. Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas antimalaria secara *in vivo* di atas adalah berupa jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit (yang dihitung terhadap 5000-an eritrosit) yang selanjutnya dikonversikan menjadi tingkat *parasitemia* (persen *parasitemia*) dan persen penghambatan zat uji terhadap pertumbuhan parasit. Persen *parasitemia* dihitung dengan rumus:

$$\%Parasitemia = \frac{\sum \text{Eritrosit yang terinfeksi}}{\text{Jumlah total eritrosit}} \times 100\%$$

Persentase penghambatan pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus:

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

di mana:

X_p = Parasitemia perlakuan = % parasitemia perlakuan ($d_n - d_0$)

X_k = Parasitemia kontrol = % parasitemia kontrol ($d_n - d_0$)

$[(X_p/X_k) \times 100\%]$ = persen pertumbuhan parasit
($d_n - d_0$) = persen parasitemia pada hari ke-n dikurangi persen parasitemia hari ke-nol.

Dari data penghambatan dan konsentrasi bahan uji kemudian dilakukan perhitungan IC_{50} , yaitu konsentrasi bahan uji yang menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50%. Untuk menentukan nilai IC_{50} digunakan analisis *Probit* menggunakan program komputasi SPSS for windows versi 16.0.

3. HASIL DAN DISKUSI

3.1 Identifikasi Fitokimia

Dari serbuk kayu ular sebanyak 1500 gram yang dimaserasi dengan etanol 96% yang dihasilkan ekstrak kental sebanyak 20,6 gram (1,37% berat). Ekstrak kayu ular berwarna coklat kehijauan, setelah dilakukan identifikasi fitokimia, didapatkan bahwa ekstrak etanol kayu ular mengandung alkaloid, terpenoid, steroid, polifenol dan glikosida. Uji kandungan alkaloid menunjukkan hasil yang sangat positif. Hasil ini sejalan dengan temuan terdahulu yakni bahwa kandungan utama kayu ular adalah senyawa-senyawa alkaloid [de Padua et al, 1999].

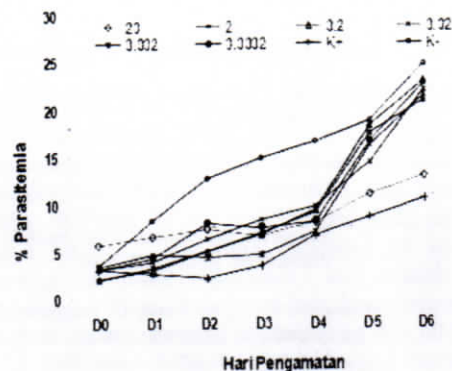
3.2 Aktivitas Antimalaria

Trend perubahan tingkat parasitemia pada mencit uji yang diberi berbagai dosis ekstrak kayu ular dan kontrol positif dan negatif selama 7 (tujuh) hari pengujian ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 1. Dari grafik tampak bahwa semakin tinggi dosis ekstrak kayu ular, aktivitas penghambatannya terhadap pertumbuhan *plasmodium* semakin kuat. Walaupun demikian, daya hambat yang ditunjukkan oleh dosis tertinggi ekstrak kayu ular (20 mg/kg BB) masih lebih rendah daripada daya hambat pertumbuhan *plasmodium* oleh klorokuin (kontrol positif). Dari grafik 1 tampak bahwa untuk semua perlakuan tidak ada yang benar-benar bisa membunuh *P. Berghei* secara nyata. Bahan-bahan uji yang diberikan hanya berperan menghambat atau memperlambat pertumbuhan jumlah *plasmodium*. Hal ini jelas terlihat dari grafik yakni setiap hari tingkat parasitemia cenderung bertambah tinggi, walaupun kenaikannya terjadi secara perlahan yang

ditunjukkan oleh kurva yang menanjak tapi landai, dibandingkan terhadap kurva kontrol negatif.

Setelah hari ke-5 (D4), umumnya tingkat parasitemia meningkat dengan cepat. Hal ini menunjukkan bahwa selama 5 hari pengujian sebelumnya, bahan-bahan uji tidak efektif menekan pertumbuhan *plasmodium*, akibatnya parasit langsung bertumbuh lagi dengan cepat setelah pemberian obat dihentikan. Hal ini juga menyiratkan bahwa waktu eliminasi terhadap senyawa-senyawa kandungan ekstrak tersebut berlangsung secara cepat, sehingga aktivitasnya menjadi cepat hilang.

Hasil perhitungan rata-rata aktivitas penghambatan ekstrak kayu ular terhadap *P. Berghei* pada mencit selama 5 hari pengujian dapat dilihat dalam Tabel 1. Analisis *Probit* yang dilakukan dengan menggunakan data dosis versus % penghambatan menghasilkan nilai IC_{50} untuk ekstrak etanol kayu ular sebesar 0,128 mg/kg BB (0,029-0,703 mg/kg BB), dengan $R^2=0,927$.



Gambar 1. Grafik Hubungan antara % Parasitemia dan Dosis Ekstrak Selama 7 Hari Pengamatan

Walaupun nilai IC_{50} ekstrak etanol kayu ular jauh lebih besar daripada IC_{50} klorokuin pada sistem uji *in-vivo*, hal ini tidak berarti bahwa senyawa aktif dari kayu ular ini tidak dapat dikembangkan sebagai obat antimalaria. Sebagaimana diketahui, klorokuin saat ini sudah tidak efektif lagi sebagai obat antimalaria, karena terjadinya resistensi *plasmodium* terhadap obat tersebut. Oleh karena itu, sangatlah memungkinkan bahwa senyawa-senyawa lain yang aktif sebagai antimalaria lalu memiliki prospek untuk dikembangkan sebagai obat antimalariapengganti klorokuin. Senyawa-senyawa dengan kerangka struktur molekul dan gugus-gugus fungsional yang berbeda dari klorokuin, kemungkinan besar memiliki mekanisme aksi yang berbeda dengan mekanisme aksi klorokuin dalam hal membunuh atau menghambat pertumbuhan

plasmodium. Dengan demikian diharapkan bahwa senyawa-senyawa tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan *plasmodium* yang sudah resisten terhadap *klorokuin*.

4. SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Kandungan utama ekstrak *etanol* kayu ular adalah senyawa-senyawa golongan *alkaloid*.
2. Ekstrak *etanol* kayu ular menghambat pertumbuhan *P. Berghei* dengan IC₅₀ sebesar 0,128 mg/kg BB mencit.
3. Aktivitas antimalaria ekstrak *etanol* kayu ular lebih rendah dibandingkan dengan *klorokuin*.

Tabel 1 Persentase Pertumbuhan dan Penghambatan Rata-Rata selama 5 Hari Pengujian (D0-D4) dengan Beberapa Dosis Ekstrak Etanol.

Dosis (mg/kg BB)	%Parasitemia Rata-Rata		% Pertumbuhan Rata-Rata	% Penghambatan Rata-Rata
	Kelompok Uji	Kontrol Negatif		
2,0 x 10 ¹	0,90	2,37	38,63	61,37
2,0 x 10 ⁰	1,82	4,32	41,90	58,10
2,0 x 10 ⁻¹	1,84	4,32	42,59	52,41
2,0 x 10 ⁻²	2,33	4,32	53,94	46,06
2,0 x 10 ⁻³	1,33	2,37	57,09	42,91
2,0 x 10 ⁻⁴	1,67	2,37	72,10	27,90

DAFTAR PUSTAKA

- Depkes RI. *Pemanfaatan Tanaman Obat*. Dirjen POM, Jakarta. 1989.
- Friederich, M. C. de Pauw, G. Llabres, M. Tits, M. P. Hayette, V. Brandt, J. Penelle, P. de Mol and L. Angenot. *New Antimalarial and Cytotoxic Sanguine Derivatives from Strychnos Icaja Roots*. *Planta Med.* pp 66, 262. 2000.
- Friederich, M. C. de Pauw, C. Prospero, M. Tits, M. P. Hayette, V. Brandt, J. Penelle, M.-P. Hayette, P. de Mol and L. Angenot. *J. Nat. Prod.*, 64, 12. 2001.
- Gritter, R.J., et al. *Pengantar Kromatografi*, Edisi Ketiga. (Terjemahan K. Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB. 1991.
- Harborne, J.B. *Metode Fitokimia*. (Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediro). Bandung: Penerbit ITB, hal. 234-259. 1987.
- Hefman, E.,. *Chromatography 3th Ed.* New York: Van Nostrand Rein Comp. pp. 81-85, 638-648. 1975.
- Heyne, K. *Tumbuhan Berguna Indonesia, jilid II*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan. Yayasan Sarana Warna Jaya. Jakarta, hal. 669-670. 1987.
- Iwasaki, T., and Ogata Y. *Medicinal Herbs Index in Indonesia, 2nd ed.* PT. Eisai Indonesia. 1995.
- Leiden University Medical Center (LUMC). *The Plasmodium Berghei Research Model of Malaria*. <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model01.html>. 2002.
- Markham, K.R.,. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid* (Terjemahan K. Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB, hal. 1-31. 1988.
- Masroerah, S., B. Sutaryo. Tumbuhan sebagai Sumber Obat Antimalaria. *Buletin ISFI Jatim, vol.22 no.1*, hal.8-16. 1994.
- Mulyaningsih, B. *Penelitian Pengaruh Berbagai Tanaman Obat Terhadap Parasit Malaria*. *Majalah Farmasi Indonesia* 6 (4), hal. 129-136. 1995.
- Saxena, S., et al., Antimalarial Agents from Plant Sources. *Current Science, vol. 85, no. 9, November*, pp.1314-1326. 2003.
- Schwikkard, S., F.van Heerden, *Antimalarial Activity of Plant Metabolites*. *Natural Products Report*, 19, September. pp. 675-692. 2002.
- Tjitra, E. *Pengobatan Malaria dengan Kombinasi Artemisinin*. *Proceeding Symposium of Malaria Control in Indonesia November 29-30*, TDC Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 63-70. 2004.
- WHO, *The Use of Antimalarial Drugs; Report of a WHO Informal Consultation*. 2001.

POTENCY OF METHANOL EXTRACT OF *Artocarpus champeden* STEM BARK TO INHIBITS THE CHLOROQUINE SENSITIVE AND CHLOROQUINE RESISTANT STRAINS OF *Plasmodium falciparum* IN-VITRO

Maximus M. Taek^{1*}, Aty Widyawaruyanti², Maria Nindatu³

¹Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Widya Mandira Catholic University,
General Achmad Yani Street No. 50-52 Kupang 85225, Indonesia
*E-mail: maximusmt2012@gmail.com

²Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

³Faculty of Medicine, Pattimura University, Ambon, Indonesia

ABSTRACT

Methanol extract obtained from a three-steps successively extraction of the Cempedak (*Artocarpus champeden*) stem bark was examined for its antimalarial activity. The extraction was done firstly with n-hexane, secondly with dichloromethane, and then with methanol. The methanol extract then subjected to examination with the chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* according to an in-vitro testing procedure developed by Trager and Jensen. The examination was conducted with non-synchronized cultures of *P. falciparum* of the 3D7 strain (the chloroquine-sensitive) and the G-2300 strain (the chloroquine-resistant) with the concentrations of extract in the microwells were 100, 10, 1.0, 0.1 and 0.01 µg/mL for 48 hours incubation. Chloroquinediphosphates was used for positive control with the concentrations of 10, 1.0, 0.1, 0.01 and 0.001 µg/mL, and DMSO for negative control. The IC₅₀ values found for the methanol extract were 4.230 g/mL on the 3D7, and 16.580 µg/mL on the G-2300 strain. At the same test condition, the chloroquinediphosphates has the IC₅₀ of 0.003 µg/mL on the 3D7 strain. From the results of the examination, we can conclude that methanol extract *A. champeden* is categorized as very active as antimalarial against the chloroquine-sensitive *P. falciparum* strain, and as active against the chloroquine-resistant strain.

Keywords: *Artocarpus Champeden*, In-vitro, *Plasmodium Falciparum*, Chloroquine

1. INTRODUCTION

Malaria is a disease spread out by an insect whose prevalence is the highest in the world. Every year the malarial disease infect 300 to 500 million people, rendering the death of 1.5 to 2.7 million people among those infected. It is estimated that 40 to 50 percent of world population are exposed to the disease with the highest risk to prevail among children below 5 years old (Saxena *et al.*, 2003; Murningsih *et al.*, 2005). Malaria is one example of the classic diseases that affect the productivity of the individual, the family and society. This disease is commonly found among poor and developing countries. African countries are the place of the highest prevalence followed by South East Asian countries, China and India (Saxena *et al.*, 2003).

Malaria is an infectious disease caused by single-cell parasites belong to protozoan group of *Plasmodium* family that live in the red blood cells and liver cells. The malarial disease is infected into the human body through the bites of female *Anopheles* mosquitoes. There are four species of *Plasmodium* that cause the malaria to

take place in human body, namely, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. ovale*. Of the four species, *P. falciparum* is the most dangerous as it can cause severe and acute or even fatal infection (Sherman, 1998) for it can attack young and old erythrocytes and causes a high risk of death for non-immune individuals (Schlesinger, 1988).

The first anti-malarial medicine is quinine, an alkaloid isolated from *Cinchona* stem bark in 1820. However, due to its wide-ranged side-effects such as tinnitus, vertigo and eye dysfunctions, the quinine was later replaced by synthetic medicines such as chloroquine, amodiaquine, and so on (Phillipson, 1991). Chloroquine then became a very important anti-malarial medicine until very recently. But this time, *P. falciparum* has become resistant against chloroquine. Although artemisinin from *Artemisia annua*, and its semi-synthetic derivatives have been found as a substitute for chloroquine, due to its high price and the fact that the problem of resistance has not been finalized, researches are still being made to look for other anti-malarial medicines from other plants. Most of the researches still utilize ethno-

pharmacology approach and bioassay-guided isolation (Schwikkard and van Heerden, 2002; Saxena, *et al.*, 2003).

Indonesian traditional society has been familiar with and using some plants as anti-malarial medicines for long time ago, one of which is the Cempedak (*Artocarpus champeden*). The cempedak is widely found in Indonesia and used by many people as food, construction material and ingredients for traditional medication. In traditional medication, the bark of the cempedak is used to cure patients infected by malaria, dysentery and various skin diseases (Heyne, 1987; Iwasaki and Ogata, 1995).

Former researches on anti-malarial activities of the cempedak conducted by Utomo (2003) and Hidayati (2004) indicated that the total methanol extract (the sample powder directly extracted with methanol), and chloroform fractions of cempedak stem bark through an in-vitro method can inhibit the growth of malarial parasites on Balb/C mice that had been infected with *P. berghei*. The total methanol extract shows the inhibition activities against the growth of parasites with the ED₅₀ of 6.95419 mg/kg of the mouse body weight (Utomo, 2003), and the chloroform fraction with ED₅₀ of 0.36479 mg/kg of the body weight (Hidayati, 2004). Therefore, it is assumed that the cempedak plant contains one or more anti-malarial active compounds that can presumably be developed into anti-malarial medicines.

In this research, an in-vitro test has been conducted to evaluate the anti-malarial activity of the methanol extract of cempedak stem bark. The methanol extract was obtained through a successively extraction technique. The objective of this research was to evaluate the potency of methanol extract to inhibit the growth of malarial parasites of both the still sensitive ones and those already resistant against chloroquine as the main referral anti-malarial medicine.

2. MATERIALS AND METHODS

Plant sample: stem bark of the cempedak was obtained from Makbalim, Salawati district, Sorong, West Irian Jaya, and identified in the Research Office of the Purwodadi Botanical Garden, Pasuruan, East Java.

Plasmodium: *P. falciparum* of the 3D7 strain (chloroquine sensitive) and G-2300 strain (chloroquine resistant) were obtained from the Eijkman Biomolecular Institute, Jakarta, and from Tropical Disease Research Center of Airlangga University, Surabaya. The *Plasmodium* was then cultivated in microwells plate according to the methods developed by Trager and Jensen (1976). The cultivation

utilized type O human red blood cells of with 5 percent haematocrit suspended into the medium of RPMI 1640 added with the inactivated type O blood serum. The cultivated plasmodia are then placed in a CO₂ incubator at the temperature of 37°C. The medium is replaced everyday with a new one until the cultivated plasmodia indicate the parasitaemia has reached the level of 1-5 percent which was observed by the smearing of thin blood film.

Comparative Substance: chloroquinediphosphates was used for positive control and dimethylsulphoxide (DMSO) for negative control.

Cempedak Stem Bark Extraction: dry powder of the cempedak stem bark was macerated successively with n-hexane, dichloromethane and methanol, each in three days. The methanol extract was then dried with rotary evaporator through decreasing pressure until the extract dries. The methanol extract was then tested for its anti-malarial activity against both *P. falciparum* strains through the in-vitro technique.

Antimalarial Activity Test: methanol extract was dissolved with DMSO and filtered sterilely with 0.22 µm membrane filter. This dissolved methanol extract was put into into a microwell that contains suspension of *P. falciparum* where the parasitaemia was 1 percent. It was diluted with mediums in a series of techniques so that final concentrations of tested materials in the microwells were as follows: 100, 10, 1.0, 0.1 and 0.01 µg/mL. Each microwell contains 4 percent haematocrit. DMSO for negative control was diluted with the same method to find the final concentration of 0.5 percent at most. Chloroquine diphosphate for positive control is also prepared with similar method and differentiated in the concentrations of 10, 1.0, 0.1, 0.01 and 0.001 µg/mL. The mixture of testing material and suspension of parasites is put in a CO₂ incubator at the temperature 37°C for 48 hours.

After the incubation of 48 hours the researchers applied a thin blood film on an object glass. The thin blood film was then dried, fixated with methanol, and stained with the Giemsa. After that the researchers counted the number of erythrocytes infected by *P. falciparum* per total countable erythrocytes under microscopy with 1000 times enlargement. The counting was made for around 5,000 erythrocytes.

From the data of number of erythrocytes infected by *P. falciparum* the researchers then counted the percentage of parasitaemia and the

inhibition percentage of tested materials against the growth of *P. falciparum* with the formulas below.

Based on the inhibition data of every extract concentration, the researchers then

counted the value of IC_{50} that is the extract concentration that inhibited the growth of 50% of *Plasmodium*) with Probit Analysis from the SPSS version 15.0.

$$\begin{aligned} \%Parasitaemia &= \frac{\text{Number of infected eritocytes}}{\text{Total of eritocytes}} \times \\ \%Inhibition &= 100\% \left[\frac{X_t}{X_c} \times \right] \end{aligned}$$

Where:

X_t = parasitaemia in treatment group = % paracytemia (48 hours – 0 hour)
 X_c = parasitaemia in control group = % parasitemia (48 hours – 0 hour)
 $[(X_p/X_k) \times 100 \%$ = *Plasmodium* growth percentage

Table 1 Inhibition Percentage of Various Methanol Extract and Chloroquine Concentrations against *P. falciparum* Growth in 48 Hours

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Average inhibition percentage against <i>P. falciparum</i> strains		
	Methanol extract		Chloroquine
	3D7	G-2300	3D7
100,000	100	69	-
10,000	41	36	100
1,000	39	29	83
0,100	3	21	70
0,010	0	0	55
0,001	-	-	49

Note: - (No tests have been conducted for the concentrations)

Table 2 The IC_{50} Values of Methanol Extract and Chloroquine against *P. falciparum* for 48 Hours

Materials	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	3D7	G-2300
Methanol extract	4.230	16.580
Chloroquine	0.003	-

3. RESULT AND DISCUSSION

Test over antimalarial activities of methanol extract and chloroquine diphosphate against non-synchronized *P. falciparum* culture of the 3D7 and G-2300 strains was conducted in-vitro. The test was conducted in a duplicate technique with 48 hours incubation period. After 48 hours the culture was taken and applied in a thin blood layer on an object glass, fixated with methanol and stained with Giemsa, and then counted its parasitaemia percentage and the tested materials' inhibition percentage.

The computation result in the inhibition percentage of various extract concentrations against the growth of *P. falciparum* of strains 3D7 and G-2300 can be seen in Table 1. Based on the inhibition percentage data in Table 1, researchers then computed the IC₅₀ value of methanol extract against each *Plasmodium* strain where the result can be seen in Table 2. According to Rasanaivo *et al.* (1992) in Ouattara *et al.* (2006), the extract that has the antimalarial activity with the IC₅₀ value smaller than 5µg/mL is said to be very active; 5–50µg/mL is categorized as active; 50–100µg/mL is categorized as less active (weak activity); and the IC₅₀ value more than 100 µg/mL is said to be not active as anti-malaria. Referring to this description, it is quite clear that methanol extract has a strong activity and categorized as very active as antimalarial against chloroquine-sensitive *P. falciparum* (the 3D7 strain), and active against the G-2300 strain of *P. falciparum* that has become resistant against chloroquine. Compared to the chloroquine, the activity of methanol extract is much weaker, around 1/1,410 times the activity of chloroquine against chloroquine-sensitive *P. falciparum*. However, as already known, the chloroquine is no longer active as antimalarial medicine, due to the resistance of *P. falciparum* against this remedy. Therefore it is quite probable that other compounds those are active as antimalarial agents then have prospect to be developed as antimalarial drugs to replace the chloroquine. Compounds whose molecular structure and functional groups are different from the chloroquine are quite possible to possess different action mechanisms from that of the chloroquine to kill or to inhibit the growth of *Plasmodium*, and as such it is expected that those compounds can kill or inhibit the growth

of *Plasmodium* that has become resistant against the chloroquine.

Maximus (2009) indicates that the methanol extract of the cempedak stem bark contains some phenolic carbonyl compounds such as flavonoid. The phenolic compounds are known to possess various biological activities. Referring to research results reviewed by Rowe *et al.* (1989), Schwikkard and van Heerden (2002), and Saxena, *et al.* (2003), it is quite clear that many compounds that indicate the antimalarial activity have one or more phenol groups in the structure of their compounds. The phenolic compounds may consist of tannins, flavonoids, xantons, lignans, stilbenes, coumarins, quinones, and so on.

4. CONCLUSION

The methanol extract of the cempedak stem bark indicates an in-vitro inhibition potency that categorized as strong or very active against the chloroquine-sensitive *P. falciparum* strain, and moderate or active against *P. falciparum* strain that has become resistant against chloroquine.

REFERENCES

- Heyne, K., *Tumbuhan Berguna Indonesia*, jilid II. Yayasan Sarana Warna Jaya. Jakarta, pp. 669-670. 1987.
- Hidayati, A.R., *Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Kloroform Kulit Batang Cempedak (Artocarpus champeden) terhadap Plasmodium berghei in-vivo*. Skripsi, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya. 2003.
- Iwasaki, T., and Ogata Y., *Medicinal Herbs Index in Indonesia*, 2nd edition. PT. Eisai Indonesia. 1995.
- Maximus, MT., *Aktivitas Antimalaria Isolat Flavonoid dari Kulit Batang Artocarpus champeden terhadap Plasmodium falciparum*. *J. Nat. Sains*, 1(1), Juli, pp. 1-4. 2009.
- Murningsih, T., *et al*, *Evaluation of the Inhibitory Activities of the Extracts of Indonesian Traditional Medicinal Plants against Plasmodium falciparum and Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* 67(8), pp. 829-831. 2005.

- Quattara, Y, S. Sanon, Y. Traore, V. Mahiou, N. Azas, and L. Sawadogo, *Antimalarial Activity of Swartzia madagascariensis* Desv. (Leguminosae), *Combretum glutinosum* Guill. & Perr. (Combretaceae) and *Tinospora bakis* Miers. (Menispermaceae), *Burkina Faso Medicinal Plants*. Afr. J. Trad. CAM, 3 (1), pp. 75-81. 2006.
- Rowe, J.W. (ed.), *Natural Products of Woody Plants*, vol.II. Berlin: Springer-Verlag, p. 1077. 1989.
- Saxena, S., Pant, N., Jain, D. C., and Bakhuni, R. S., *Antimalarial Agents from Plant Sources*. *Current Science*, vol. 85, no. 9, November, pp.1314-1329. 2003.
- Schlesinger, P.H., et al., *Antimalarial Agents: Mechanims of Action*. *J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. June, pp.793-798. 1988.
- Schwikkard, S., and F.van Heerden, *Antimalarial Activity of Plant Metabolites*. *Natural Products Report*, 19, September: pp. 675-692. 2002.
- Utomo, N.D.W., *Aktivitas Antimalaria Ekstrak Methanol Kulit Batang Cempedak (Artocarpus champeden Spreng.) terhadap Plasmodium berghei in-vivo*. Skripsi, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya. 2003.