

IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA KIMIA PADA *Wedelia Biflora* DAN UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIPLASMODIUM BERGHEI

Identify Chemical Compounds of Wedelia biflora and Test Their Bioactivity as Antiplasmodium Berghei

M. Isa¹

¹Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh
E-mail: keuchik_isa@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kandungan senyawa daun sernai (*Wedelia biflora*) dengan mengidentifikasi serta menguji aktivitas antiplasmodiumnya secara *in vivo* terhadap *Plasmodium berghei* dengan metoda *The 4-day test*. Maserasi daun *Wedelia biflora* memakai pelarut metanol. Hasil uji fitokimia menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard daun sernai positif mengandung senyawa triterpenoid dan analisis kromatogram dengan GC-MS mengidentifikasi 45 puncak senyawa dengan kelimpahan paling tinggi sebesar 27,92% yang teridentifikasi dalam *data base* sebagai kaur-16-en-18-oic acid. Ekstrak daun sernai berpotensi aktif sebagai antiplasmodium dengan nilai $IC_{50} = 39,952$ mg/kg BB.

Kata kunci: antiplasmodium, GC-MS, *Plasmodium berghei*, *Wedelia biflora*

ABSTRACT

The aims of the research is to identify chemical compounds of leaf Sernai (*Wedelia biflora*) and test their bioactivity as antiplasmodium against of *Plasmodium berghei*. Extraction of the compounds from the *Wedelia biflora* leaf was done with methanol. To observe the bioactive potency of the *Wedelia biflora* extract antiplasmodium test against with *The 4-day test method* was done. The Phytochemical test results using the Lieberman-Burchard reagent positive for triterpenoids compounds and analysis by GC-MS chromatogram identified 45 compounds with an abundance peak maximum of 27.92% which is identified in the *data base* as kaur-16-en-18-oic acid. *Wedelia biflora* leaf extract potentially active as antiplasmodium with IC_{50} values = 39.952 mg / kg BW.

Key words: antiplasmodium, GC-MS, *Plasmodium berghei*, *Wedelia biflora*

PENDAHULUAN

Penyakit malaria disebabkan oleh *Plasmodium sp.* Spesies plasmodium yang menginfeksi manusia tidak dapat menginfeksi hewan model nonprimata. Oleh karena itu, evaluasi *in vivo* senyawa antiplasmodium dapat menggunakan parasit malaria golongan rodensia *Plasmodium berghei* (*P. berghei*), *P. yoelii*, *P. chabaudi*, dan *P. vinckei*. Pada *P. berghei*, morfologi dan lingkaran hidupnya hampir sama dengan parasit malaria manusia yaitu perpaduan antara sifat sifat dari *P. falciparum* dan *P. vivax* (Richardson dan Sauchyn, 2007) sehingga *P. berghei* bisa dipakai sebagai model penelitian, terutama untuk pengembangan obat-obat malaria (Ager *et al.*, 1984; Peters *et al.*, 1999).

Pengembangan obat malaria saat ini berkembang pesat disebabkan pada beberapa obat malaria telah mengalami resistensi terhadap parasit. Selain itu adanya keberhasilan dan penemuan tanaman *Artemisia annua* (Qinghaosu) di Cina pada tahun 1970 dan diterima di seluruh dunia untuk pengobatan malaria resistensi, telah membuat perhatian dunia terpusat pada pengembangan obat antimalaria dari tanaman (Taylor dan Berridge, 2006). Qinghaosu ini telah digunakan masyarakat Cina sebagai obat tradisional sejak 2000 tahun lalu (Huang, 1984). Obat ini telah direkomendasikan *World Health Organization* (WHO) untuk pasien yang mengalami resisten terhadap klorokuin strain *P. falciparum*.

Pengobatan malaria menggunakan sediaan tanaman banyak digunakan, seperti di negara Afrika, Amerika Latin, dan Asia Tenggara (Omar, 2000). Upaya-upaya pengembangan obat tradisional antimalaria bersumber dari tanaman ditempuh dalam waktu yang panjang karena harus melewati beberapa fase, seperti uji preklinik yang dilakukan pada hewan coba (Srisilam, dan Veersham, 2003). Hal ini dilakukan agar teruji khasiat dan keamanannya sehingga dapat bisa dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Untuk itu, informasi etnobotani tanaman antiplasmodium untuk mengatasi malaria sangat diperlukan agar dapat dievaluasi lebih lanjut khasiat dan kemanjurannya dengan mengisolasi dan mengidentifikasi serta menguji bioaktivitasnya sebagai bakal obat antimalaria tersebut (Awadh *et al.*, 2004).

Salah satu tanaman yang merupakan satu keluarga dengan tumbuhan *Artemisia annua* y adalah *Wedelia biflora*. Tanaman ini berkhasiat sebagai antiplasmodium secara *in vitro* (Isa, *et al.*, 2007). Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa ekstrak metanol daun sernai mampu menghambat *P. falciparum* dan bekerja pada tahap trophozoit dari serangkaian siklus pertumbuhan plasmodium. Tanaman ini telah lama digunakan untuk pengobatan secara empiris untuk mengatasi demam (antipiretik). Sifat antipiretik inilah yang bisa membantu penderita malaria dalam melawan penyakitnya (Sastrapradja, 1986; Heyne, 1987; Wu, 2001). Berdasarkan uraian di

atas, perlu diketahui kandungan senyawa aktif daun *Wedelia biflora* dan potensinya sebagai antiplasmodium secara *in vivo* perlu. Penelitian lanjutan ini ditujukan untuk mengkaji kandungan aktif daun *Wedelia biflora* dan mengujinya untuk mengetahui bioaktivitasnya sebagai antiplasmodium. Kajian ini akan memberikan harapan baru terhadap pengembangan obat malaria dengan memanfaatkan sumberdaya lokal serta untuk mengatasi kejadian resistensi obat terhadap parasit plasmodium.

MATERI DAN METODE

Bahan tumbuhan yang diteliti adalah daun *Wedelia biflora*, yang berumur lebih dari 1 tahun dan panjang tanaman telah lebih dari 0,5 meter. Sampel yang diambil adalah daun pada ketinggian 0,8 meter dari permukaan tanah dan berasal dari daerah Darussalam, Banda Aceh.

Ekstraksi dan Isolasi

Daun tumbuhan *Wedelia biflora* yang masih segar dikering-anginkan dan terhindar dari cahaya matahari (Jones dan Kinghorn, 2005) pada suhu ruangan (Chen *et al.*, 2007), dipotong potong sepanjang 0,25 cm kemudian ditimbang sebanyak 3 kg untuk maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Pelarut yang digunakan diganti setiap 24 jam sekali. Ekstrak diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30-40° C sampai diperoleh ekstrak kasar/kental (Silva *et al.*, 1998). Selanjutnya, dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui senyawa terpenoid menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard. Bila berwarna merah, positif adanya senyawa terpenoid. Bila berwarna ungu positif, adanya senyawa steroid. Ekstrak yang positif terpenoid selanjutnya diuji bioaktivitasnya sebagai antiplasmodium kemudian dilanjutkan ke tahap identifikasi menggunakan kromatografi gas-spektroskopi massa (GC-MS).

Infeksi Mencit

Plasmodium berghei diinokulasikan dalam tubuh mencit dengan menyuntikkan eritrosit yang mengandung parasit yang telah disuspensikan dalam larutan 0,2 ml ACD. Eritrosit yang mengandung parasit dengan konsentrasi 1×10^7 yang dilarutkan dalam natrium sitrat 2%, disuntikkan secara intraperitoneal sebanyak 0,25 ml, ditunggu sampai parasitemia mencapai 30-40%. Bila parasitemia telah mencapai 30-40% maka dilakukan inokulasi pada mencit yang telah disiapkan sebagai subyek penelitian (Knight dan Peters, 1980).

Uji Aktivitas Antimalaria terhadap *P. berghei*

Uji *in vivo* akan dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan mencit jantan (*Mus musculus*) galur *Double Dics Webster* (DDW) sebagai model, berat badan 25-30 g, dan umur 12 minggu. Mencit diinokulasi secara intraperitoneal dengan *P. berghei* yang diperoleh dari Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Mencit yang telah mengalami adaptasi dipilih sebanyak 54 ekor. Masing-masing dibagi atas 9 kelompok sehingga tiap kelompok terdiri atas 9 ekor mencit. Kelompok I (KI), digunakan sebagai kontrol yang diberi larutan akuades, Kelompok II (KII), diberi *P. berghei* dan klorokuin 5 mg/kg BB, sedangkan kelompok perlakuan yaitu Kelompok III (KIII), IV (KIV), dan V (KV), diberi *P. berghei* dan dengan dosis 30, 45, dan 60 mg/kg BB satu kali per hari selama 3 hari berturut-turut. Sebelum pemberian ekstrak daun serai berikutnya diperiksa dan dihitung dulu persentase parasitemia darah mencit dengan membuat preparat apus sampai hari ke-4, kemudian diamati hari kematian masing-masing mencit (*The 4-day test*) (Knight dan Peters, 1980).

Pengamatan parasitemia dilakukan dengan menghitung jumlah sel darah merah yang terinfeksi *P. berghei* per 1000 sel darah merah. Data persentase parasitemia setelah perlakuan pada masing masing konsentrasi senyawa uji dibandingkan dengan persentase parasitemia kontrol, sehingga didapatkan persentase penghambatan pertumbuhan parasit.

Analisis Data

Data pengamatan persentase parasitemia dianalisis menggunakan analisis regresi probit SPSS terhadap data persentase penghambatan. Aktivitas antiplasmodium *in vivo* dinyatakan dengan besarnya nilai IC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Ekstrak Metanol Daun *Wedelia biflora*

Hasil ekstraksi dengan cara maserasi menunjukkan bahwa ekstrak metanol tersebut positif mengandung senyawa terpenoid. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya warna ungu setelah ekstrak metanol setelah direaksikan dengan pereaksi Liebermann Burchard. Senyawa terpenoid dalam ekstrak metanol umumnya mengikat oksigen dalam jumlah yang banyak (*highly oxygenated compound*) sehingga cenderung lebih polar. Identifikasi ekstrak metanol daun *Wedelia biflora* dilakukan menggunakan kromatografi gas-spektroskopi massa Shimadzu (GC-MS). Metode ini bisa digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa, baik satu komponen maupun campuran (Sastrohamidjoyo, 1985). Keuntungan spektrometri massa ini adalah dalam menentukan fragmentasi dan molekul molekul serta mengidentifikasi komponen komponen yang terdapat dalam jumlah kecil (Harbone, 1987).

Spektrum GC-MS ekstrak metanol menunjukkan bahwa, terdapat 45 senyawa. Dari ke-45 senyawa ini yang teridentifikasi berdasarkan *data base* hanya 3 senyawa yang mempunyai kelimpahan tertinggi yaitu berturut turut 27,92; 19,49; dan 12,18% dengan waktu retensi masing-masing 26,877; 25,715; dan 27,485. Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor. Waktu retensi ini diukur berdasarkan waktu ketika sampel diinjeksikan sampai sampel

menunjukkan ketinggian puncak yang maksimum. Identifikasi komponen kimia ekstrak *Wedelia biflora* dengan *data base Willey7 Library* dan *NIST Library* disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 terlihat bahwa kelompok senyawa kaur memiliki tingkat kemiripan 78-82%, untuk kelompok senyawa 1,2 *benzenedicarboxylic acid* mempunyai kemiripan mencapai 96%, senyawa ini termasuk dalam kelompok asam lemak. Adanya senyawa kaur menunjukkan bahwa senyawa ini termasuk golongan terpenoid (Milles, 1990; Wu, 2001). Miles *et al.* (1990) melaporkan bahwa senyawa kimia dari golongan terpenoid dan steroid telah diisolasinya antara lain asam 16 mutilkaur-15-en-19-oat; 24-etilkropostanone; stigma-7-en-3-ol, stigmasetrol, glandiflorat dan asam entkauradienoat (Gambar 1).

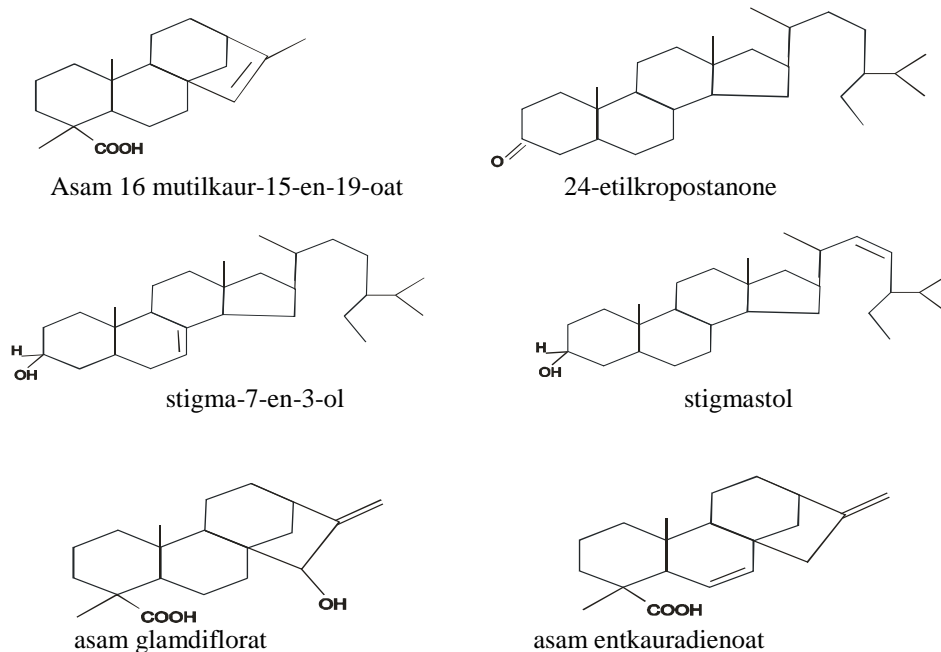
Namun, senyawa yang ditemukan ini beraktivitas sebagai antimakan terhadap kumbang buah kapas, dan anti jamur. Bila kita bandingkan dengan identifikasi oleh Chen (2007), yang lebih dahulu melakukan isolasi dan identifikasi terhadap tanaman *Wallostonia biflora* L, yang belakangan ini diketahui merupakan nama lain dari *Wedelia biflora* DC (Wu, 2001). Chen (2007) mendapatkan tiga *seskuiaterpena-seskuiaterpena germacrane-type* baru (1-3), dua *diterpena-diterpena pimarane-type* yang baru (4, 5), dan suatu *glikosida naftalena* yang baru (-6), beserta 11 campuran lainnya, - metoda kimia. yaitu *darutoside*, 10,11 spathulenol, 12 *darutigenol*, 10 3,3', 4', 7' - *tetramethoxy-5-hydroxyflavone*, 13,7-dimethoxy-3',4', 5-trihydroxyflavone, 13 3-methoxy-3',4',5,7-tetrahydroxyflavone, 14 *pubesideB*, 152 - *carbomethoxy - 3 - prenyl - 1,4 - naphthohydroquinone diglucoside*, 17 6-*O-acetylscandoside*, 18 dan *scandoside*. Namun, isolasi ini mempunyai aktivitas

melawan hepatoseluler karsinoma.

Pengujian Fraksi Secara In Vivo

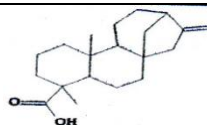
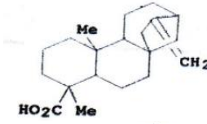
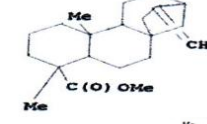
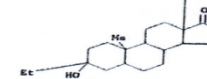
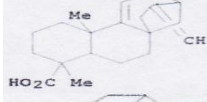

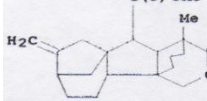
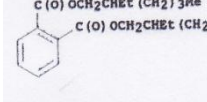
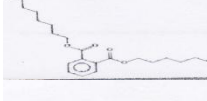
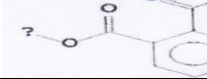
Hasil uji aktivitas antiplasmodium disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pemberian ekstrak metanol pada dosis 60, dan 45 mg/kg BB sangat efektif terhadap pertumbuhan plasmodium yakni mencapai 50%, tetapi secara umum penghambatan ini masih jauh dibandingkan dengan obat standar klorokuin yang mencapai 80% lebih. Aktivitas antiplasmodium *in vivo* ekstrak metanol dianalisis berdasarkan nilai IC₅₀ yaitu nilai konsentrasi zat uji yang dibutuhkan menghambat pertumbuhan plasmodium di dalam sel darah merah sebesar 50%. Nilai IC₅₀ ditetapkan berdasarkan hubungan antara konsentrasi ekstrak uji dengan persentase penghambatan pertumbuhan parasit pada media erytrosit dengan pengujian analisis regresi probit. Dari hasil nalisis probit tersebut diperoleh informasi mengenai konsentrasi efektif ekstrak metanol daun *Wedelia biflora* terhadap pertumbuhan plasmodium *in vivo*. Semakin kecil harga IC₅₀ maka semakin besar efektivitas penghambatan ekstrak terhadap pertumbuhan *P. berghei*. Dari hasil uji bioaktivitas sebagai antiplasmodium secara *in vivo*, ekstrak daun *Wedelia biflora* bersifat aktif dengan nilai IC₅₀= 39,952 mg/kg BB. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Isa *et al.* (2007) dan Rinidar *et al.* (2013) bahwa secara *in vitro* ekstrak metanol daun *Wedelia biflora* juga mempunyai aktivitas sebagai antiplasmodium dengan nilai IC₅₀ yang paling baik pada inkubasi 32 sebesar 5,253 µg/ml. Dengan demikian, dari hasil penelitian dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol daun *Wedelia biflora* mempunyai bioaktivitas sebagai antiplasmodium baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.



Gambar 1. Senyawa kimia yang telah diisolasi

Tabel 1. Analisa GC-MS untuk 3 senyawa dengan kelimpahan tertinggi teridentifikasi pada ekstrak metanol *Wedelia biflora*

No	Kandungan senyawa (%)	Senyawa kimia teridentifikasi	
1.	27,92	kaura-9(11),16-dien-18-oic acid, (4 beta)-kaur-16en-19-oic acid . Acide kaureneque. Agrophylic acid. Isocunabic.	
2.	27,92	kaura-9(11),16-dien-18-oic acid, (4 beta)-kaur-16en-19-oic acid . Acide kaureneque. Agrophylic acid. Isocunabic	
3.	27,92	methyl ent-16-kauren-19-oate. kaur-16en-18-oic acid, methyl ester ,(4beta)-(CAS) (-)-Kaur-16-En-1	
4.	27,92	Androstan-16-en-3-one, (5alpha)-(CAS)Androst-16-en-3-one. 5.alpha-androstenone.5.alpha –Androst-16-en-3-o3-	
5.	19,49	Kaura-9(11),16-dien-18-oic acid, (4 alpha)-(CAS) KAURA-,16-DIEN-19-OIC ACID.Grandiflorenic acid	
6.	19,49	Gibbane-1,10-dicarboxylic acid, 4a (hydroxymerhyl)-1-methyl-8-methylene,1,4a-lactone, 10-methyl ester (1.alpha,4)	
7.	19,49	Gibberellin A15 Methyl Ester (Gibbane-1,10-dicarboxylic acid, 4a (hydroxymerhyl)-1-methyl-8-methylene,1,4a-lactone, 10-methyl ester (1.alpha,4)	
8.	12,48	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl)ester (CAS) Bis (2-ethylhexyl) phthalate	
9.	12,48	Di-n-octyl phthalate	
10	12,48	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dioctyl phthalate. Hexaplas.Isooctyl phthalate	

Tabel 2. Persentase parasitemia dan penghambatan rata rata *P. berghei* setelah diberi fraksi ekstrak metanol daun *Wedelia biflora*

Perlakuan	Rata rata persentase parasitemia (%)	Rata rata persentase hambatan (%)
KI (akuades; 0,2 ml/hari)	38,00±5,77	-
KII (5 mg/kg BB; klorokuin)	4,00±0,58	89,47
KIII (30 mg/kg BB; ekstrak daun sernai)	21,06±2,4	42,04
KIV (45 mg/kg BB; ekstrak daun sernai)	17,12±1,30	54,94
KV (60 mg/kg BB; ekstrak daun sernai)	15,37±1,30	58,96

KESIMPULAN

Ekstrak metanol mengandung senyawa triterpenoid dan GC-MS mengidentifikasi 45 puncak senyawa dengan kelimpahan paling tinggi sebesar 27,92% yang teridentifikasi dalam *data base* sebagai *kaur-16-en-18-oic acid*. Daun sernai mempunyai aktivitas sebagai antiplasmodium dengan nilai IC₅₀ pada konsentrasi 39,952 mg/kg BB mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei* sebesar 50%.

DAFTAR PUSTAKA

Ager, A.L. Jr. 1984. Rodent Malaria Models. In **Handbook of Experimental Pharmacology**. Peters, W. and W.H.G. Richards (Eds.) Springer-Verlag, Germany.

Awadh, A.N., A. Al-Rahwi, and B. Lindequest. 2004. Some medicinal plant used in Yameni herbal medicine to treat malaria. **Afr. J. Traditional.** I:72-74.

Chen, W., W. Tang, R. Zhang, L. Lou, and W. Zhao. 2007. Cytotoxic germacrane-type sesquiterpenes, pimarane-type diterpenes and a naphthalene derivative from *Wallostonia biflora*. **J. Nat/Prod.** 70:567-570.

- Harbone, J.B. 1987. **Metode Fitokimia**. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan 2. ITB. Bandung.
- Heyne, K. 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia**. Jilid III. Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kehutanan, Jakarta.
- Huang, L. 1984. **Drug Research Based Upon The Leads of The Chinese Traditional Medicine**.
- Isa, M., Rinidar, T. Armansyah. 2007. Aktivitas Antiplasmodium *In Vitro* Ekstrak Metanol Daun Sernai (*Wedelia biflora*) terhadap *Plasmodium falciparum*. **Laporan Penelitian**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Jones, W.P. and D.G. Kinghorn. 2005. **Extraction of Plant Secondary Metabolites: Methods in Biotechnology**. 20th ed. Humana Press Inc., Totowa, New York.
- Knigt, B. and C. Peters. 1980. Antiplasmodial effects of the aqueous extract of *Phyllanthus amarus* Schumacher and Thonn against *Plasmodium berghei* in Swiss Albino Mice. **Nigerian J. Physiological Sci.** 22(1-2):19-25
- Nurmalahayati. 1999. Uji Bioaktif Insektisida Ekstrak Daun *Wedelia biflora* terhadap Mortalitas Kutu Beras (*Calandra oryzae*). **Skripsi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.
- Omar, S. 2000. Phytochemical Discovery of Antifeedant, Antimicrobial and Antimalarial Principles. **Disertation**. School of Graduate Studies Research University of Ottawa. Canada
- Peters, W. and B.L. Robinson. 1999. **Handbook of Animal Models of Infection**. Academia, London.
- Razali, N. 2001. Uji Aktivitas Antimicrobial Ekstrak Akar Tumbuhan *Wedelia biflora*. **Skripsi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.
- Richardson, M.J and L. Sauchyn. 2007. **A Population Genetics Model of Malaria (*Plasmodium berghei*) Resistance in the Mosquito Vector *Anopheles Stephensi***. University of Alberta, Canada.
- Rinidar, M.Isa, dan T. Armansyah. 2013. Nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀) ekstrak metanol daun sernai (*Wedelia biflora*) terhadap *Plasmodium Falciparum* yang diinkubasi selama 32 dan 72 jam. **J. Medika Vet.** 7(1):8-12.
- Sastrapradja, S. Nagai, dan Y. Naito. 1986. **Indeks Tumbuhan Obat di Indonesia**. PT. Eisai, Indonesia.
- Sastrohamidjoyo, H. 1985. **Spektroskopi**. Liberty, Yogyakarta.
- Silva, G., I-K. Lee, and D.A. Kinghorn. 1998. **Special Problems with the Extraction of Plants: Methods in Biotechnology**. 4th ed. Humana Press Inc, Totowa, New York.
- Srisilam, K., and C. Veersham. 2003. Antimalarials of Plant Origin. In **Role of Biotechnology in Medicinal and Aromatic Plants**. Nishan, I. and A. Khanu (Eds.). Humana Press Inc, Totowa, New York.
- Taylor, S. and V. Berridge. 2006. **Medicinal Plants and Malaria: An Historical Case Study of Research at the London School of Hygiene and Tropical Medicine in the Twentieth Century. Review**. The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. London.
- Wu, D.L., Q.M. Hu., and N.H. Xia. 2001. **Index of the Plants in Hongkong**. Guangdong Dongsheng Press, Guangdong.