

**Profil Kromatogram dan Spektrogram Isolat Antimalaria dari Ekstrak
Diklorometana Kulit Batang *Artocarpus champeden* Spreng.
(*Chromatogram and Spectram Profiles Antimalarial Isolate from
Dichloromethane Extract of Artocarpus champeden Spreng. Stem Bark*)**

Nuri

Staf Pengajar Program Studi Farmasi Universitas Jember

ABSTRACT

The isolate which possessed antimalarial activity had been isolated from dichloromethane extract of Artocarpus champeden Spreng. Stem bark. The isolate inhibited Plasmodium falciparum growth in vitro by IC_{50} 0.024 ± 0.011 $\mu\text{g/ml}$. Chromatogram and spectram of isolate analysis showed that it contained flavonol as a major compound.

Keywords : Artocarpus champeden Spreng., antimalarial activity, flavonol

PENDAHULUAN

Penyebaran parasit malaria yang resisten, terutama *Plasmodium falciparum* terhadap antimalaria utama klorokuin yang begitu cepat dan luas hampir di seluruh daerah endemik malaria di dunia, telah mendorong para peneliti untuk menemukan antimalaria baru yang lebih poten. Berbagai pendekatan dilakukan dalam menemukan molekul baru antimalaria diantaranya melalui 1) modifikasi molekul yang terbukti mempunyai aktivitas antimalaria, 2) penelitian terhadap metabolit spesifik parasit untuk menemukan antimetabolit ataupun melalui 3) eksplorasi terhadap bahan alam terutama tanaman obat yang secara tradisional digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan malaria.

Penelitian terhadap bahan alam dalam usaha menemukan senyawa baru antimalaria dilakukan secara intensif oleh beberapa peneliti di dunia pada beberapa dasawarsa terakhir ini. Hal ini didasarkan pada beberapa alasan yaitu alkaloid alami kuinin yang telah digunakan sebagai antimalaria sejak sekitar tahun 1630 sampai sekarang masih menunjukkan efektivitasnya dalam melawan *P. falciparum* yang resisten klorokuin. Sementara beberapa antimalaria baru seperti klorokuin, amodiakuin, proguanil, pirimetamin dan sulfadoksin telah dilaporkan terjadi resistensi hanya beberapa tahun setelah pemakaiannya di lapangan. Kedua, penemuan antimalaria baru artemisinin dan turunannya dari tanaman *Artemisia annua* yang secara tradisional telah digunakan beratus-ratus tahun di Cina membuktikan bahwa tanaman obat merupakan sumber prototipe antimalaria baru yang potensial untuk terus digali dan diteliti (Mustofa, 2003).

Di Indonesia, salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria adalah *Artocarpus champeden* Spreng. (cempedak) dari suku Moraceae. Tanaman ini tumbuh terpusat di Asia Tenggara dan banyak ditemukan di Indonesia. Di Irian Jaya, secara empiris kulit batang tanaman ini telah digunakan untuk mengobati penyakit malaria disamping untuk obat disentri dan penyakit kulit. Kulit batang cempedak mengandung senyawa utama golongan flavonoid antara lain artokarpin, heteroflavanon-A, senyawa baru siklocampedol bersama dengan empat senyawa triterpen yaitu sikloeukalenol, glutinol, sikloartenon, dan 24-metilsikloartanon, serta suatu sterol, β -sitosterol. (Hakim *et al.*, 1998).

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi kulit batang *A. champeden* dan dilanjutkan dengan isolasi yang dipandu aktivitas antimalaria. Isolat yang dihasilkan selanjutnya dianalisis secara kromatografi dan spektroskopi.

METODE

Bahan dan Alat

Kulit batang *A. champeden* yang digunakan diambil dari desa Makbalim, kecamatan Salawati, kabupaten Sorong, Irian Jaya Barat (Agustus 2004) dan diidentifikasi di Herbarium Bogoriense LIPI, Bogor. Proses ekstraksi dan isolasi menggunakan bahan n-heksana teknis, diklorometana teknis, etil asetat teknis (semua bahan teknis diredistilasi), kloroform p.a. (E Merck), lempeng silika GF₂₅₄ (E Merck), lempeng silika RP-8. Untuk uji aktivitas antimalaria digunakan air suling, RPMI 1640, HEPES buffer, natrium bikarbonat, gentamisin sulfat, serum manusia, eritrosit manusia,

minyak imersi, pewarna giemsa, dan dapar fosfat.

Alat yang digunakan adalah kolom kromatografi, mikropipet (socoex), bak kromatografi (camag), rotavapor (buchi R-114 dan buchi R-153), timbangan analitik (ohaus 2140), kromatografi cair kinerja tinggi (Hewlett Packard Agilent 1100), spektrometer FTIR (Perkin Elmer), spektrometer FT-NMR (Hitachi R-1900), pipet ukur dan pipet volume, laminar air flow, mikroskop (olympus CH 20), lempeng sumur mikro (24 well).

Ekstraksi dan Isolasi

Serbuk kulit batang *A. champeden* diekstraksi dengan n-heksana untuk menghilangkan lemak. Residu dikeringkan kemudian diekstraksi kembali dengan diklorometana menghasilkan ekstrak diklorometana. Ekstrak diklorometana dipisahkan secara kromatografi kolom vakum dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak berturut-turut n-heksana, diklorometana dan metanol (penurunan gradien konsentrasi 5%) menghasilkan fraksi-fraksi. Berdasarkan hasil uji aktivitas antimalaria fraksi-fraksi, dipilih fraksi yang paling aktif untuk diisolasi lebih lanjut sehingga akhirnya dihasilkan isolat yang aktif sebagai antimalaria. Selanjutnya isolat dianalisis secara kromatografi dengan kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair kinerja tinggi dan secara spektroskopi dengan spektrometer FTIR dan spektrometer FT-NMR.

Uji Aktivitas Antimalaria

Parasit malaria yang digunakan untuk uji, dibiakkan menggunakan metode Trager dan Jensen (1976). Pembiakan dilakukan pada cawan petri dan dikerjakan secara aseptik. Pada uji kali ini digunakan *P. falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap kloroquin. Untuk pengujian antimalaria, digunakan cara tes mikro yang didasarkan pada teknik Reickmann dkk. yang kemudian disempurnakan oleh WHO (WHO,1985). Bahan uji dilarutkan dalam DMSO, diencerkan sampai kadar tertentu dalam medium RPMI 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO₃. Larutan disterilkan dengan saringan berdiameter 0,45 µm dan diencerkan secara seri. Masing-masing lempeng sumur mikro diisi dengan larutan bahan uji dan ditambahkan suspensi 5% eritrosit dengan parasitemia 1% sehingga masing-masing sumur berisi 1000 µL medium yang mengandung bahan uji dengan konsentrasi 0,0001 ; 0,001 ;

0,01 ; 0,1 ; 1 ; dan 10 µg/ml. Kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 48 jam, dan dilakukan evaluasi hasil. Uji ini dilakukan dua kali replikasi. Sebagai pembanding adalah kloroquin difosfat. Kontrol negatif adalah DMSO yang diencerkan dengan medium lengkap sedemikian rupa sehingga di dalam sumur mikro (1000 µl) diperoleh kadar dimetilsulfoksida 0,5%.

Setelah diinkubasi selama 48 jam, lempeng sumur mikro dikeluarkan, sediaan uji dicampur sampai homogen dan disentrifus, filtratnya dibuang dan bagian yang pekat dibuat sediaan lapisan darah tipis. Sediaan dikeringkan pada suhu kamar, difiksasi dengan metanol, kemudian setelah kering diwarnai dengan larutan giemsa 20% dalam aqua selama 10 menit. Evaluasi dilakukan dengan cara menghitung jumlah eritrosit terinfeksi pada setiap 5.000 eritrosit di bawah mikroskop (Noster, 1990). Kemudian dihitung persen hambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum* Hambatan pertumbuhan 50% (IC₅₀) ditentukan menggunakan analisis probit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi, Isolasi dan Aktivitas Antimalaria

Sebanyak 1350 gram serbuk kulit batang *A. champeden* diekstraksi dengan n-heksana untuk menghilangkan lemak. Residu dikeringkan kemudian diekstraksi kembali dengan diklorometana. Terhadap 12 gram ekstrak diklorometana dilakukan pemisahan secara kromatografi kolom vakum menghasilkan 15 fraksi.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antimalaria maka dipilih fraksi 14 (985 mg) untuk diisolasi lebih lanjut. Terhadap fraksi 14 dilakukan kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak heksan-etilasetat menghasilkan 8 subfraksi. Terhadap subfraksi 6 dilakukan kromatografi lapis tipis preparatif dengan fase diam silika gel RP-8 dan fase gerak asetronitril : methanol : air (2 : 1 : 1) menghasilkan isolat seberat 4 mg. Pada analisis selanjutnya diketahui bahwa isolat tersebut mengandung senyawa dominan golongan flavonoid.

Aktivitas antimalaria dinyatakan dengan nilai IC₅₀, semakin kecil nilai IC₅₀ semakin poten sebagai antimalaria. Pada uji aktivitas antimalaria ekstrak diklorometana, fraksi 14, isolat dan kloroquin difosfat diperoleh nilai IC₅₀ berturut-turut 0,974 ± 0,181; 0,189 ±

0,016; $0,024 \pm 0,011$ dan $0,003 \pm 0,001$ $\mu\text{g/ml}$.

Fidock (2006), menyebutkan bahwa suatu senyawa dianggap memiliki aktivitas antimalaria jika memiliki IC_{50} kurang dari 1 μM . Senyawa flavonoid memiliki berat molekul 232 maka 1 μM setara dengan 0,232 $\mu\text{g/ml}$. Pada penelitian ini isolat memiliki IC_{50} 0,024 $\mu\text{g/ml}$, yaitu kurang lebih 1/10 kali lebih rendah dari batasan tersebut, maka dapat dikatakan isolat aktif sebagai antimalaria.

Meskipun isolat memiliki aktivitas antimalaria lebih rendah dibandingkan kloroquin difosfat, bukan berarti isolat tersebut tidak memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria. Seperti telah disebutkan di atas, pada analisis selanjutnya dapat diketahui bahwa isolat mengandung senyawa utama golongan flavonoid. 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.

Dari berbagai literatur, 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 terhambat (Biagini et al., 2003). Cyclochampedol, suatu senyawa flavonoid terisoprenilasi yang diperoleh dari *Artocarpus champedon* Spreng, dapat menghambat transportasi asam amino leusin melalui membran usus ulat sutera *Bombyx mori* (Parenti et al., 1998). Ada kemungkinan bahwa senyawa tersebut juga dapat menghambat transportasi asam-asam amino melewati membran vakuola makanan parasit. Sebagian besar flavonoid memiliki gugus karbonil tak jenuh- α, β . Oleh sebab itu ada kemungkinan flavonoid juga memiliki mekanisme kerja yang sama.

Dari beberapa kemungkinan mekanisme yang disebut di atas, semuanya berbeda dengan mekanisme kerja obat-obat antimalaria yang sudah ada saat ini. Oleh sebab itu isolat tersebut yang mengandung senyawa dominan flavonoid memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat antimalaria.

Analisis dan Identifikasi Isolat

Isolat yang dihasilkan dianalisis secara KLT dengan berbagai macam fase gerak menggunakan penampak noda uap amonia yang menampakkan noda tunggal berwarna kuning intensif. Ini menunjukkan bahwa isolat tersebut mengandung senyawa flavonoid. Tetapi dengan cara KLT saja belum menjamin bahwa isolat benar-benar murni senyawa flavonoid. Oleh sebab itu dilakukan analisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang daya pisahnya lebih baik dibandingkan KLT (Mulya dan Suharman, 1995).

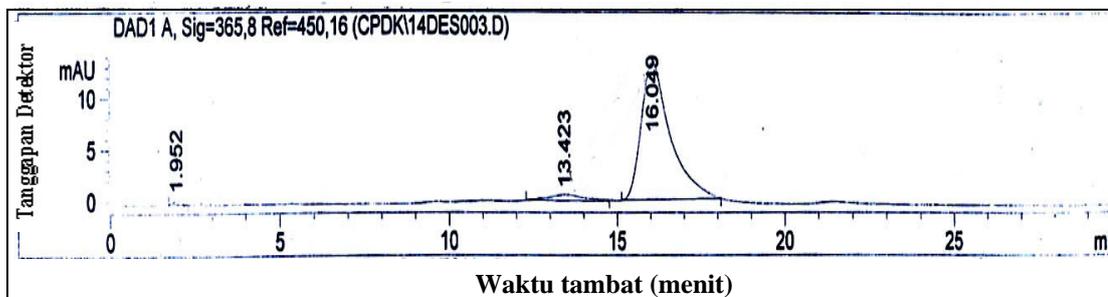
Pada kromatogram KCKT terdapat satu puncak dominan pada R_t 16 menit disamping puncak-puncak lainnya (Gambar 1). Adanya puncak-puncak ini menandakan bahwa masih ada senyawa lain disamping senyawa yang dimaksud, meskipun secara KLT hanya menunjukkan satu noda.

KCKT yang dipergunakan memakai detektor *Photo Diode Array* yang memiliki rentang pengukuran 190 – 600 nm. Detektor ini disamping bisa digunakan untuk melihat profil kromatogram juga bisa untuk melihat spektrum UV-Vis masing-masing puncak kromatogram. Spektrum UV-Vis puncak kromatogram pada R_t 16 menit menunjukkan adanya dua panjang gelombang maksimum (λ_{max}) yaitu pada 265 nm dan 387 nm (Gambar 2). Profil spektrum ini identik dengan profil spektrum UV-Vis flavonol. Menurut Markham (1985), flavonol memiliki dua λ_{max} yaitu antara 250 – 280 nm dan antara 350 – 385 nm. λ 265 nm berkaitan dengan absorpsi oleh sistem cincin sinamoiil, sedangkan λ 387 nm berkaitan dengan absorpsi oleh sistem cincin benzoil yang dimiliki oleh flavonol (Marby et al., 1970).

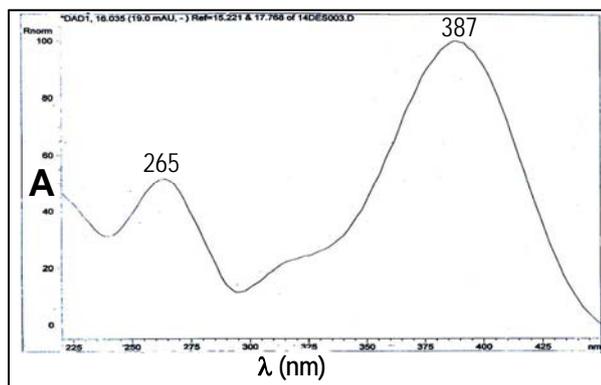
Untuk lebih menguatkan dugaan bahwa isolat mengandung senyawa flavonol, dilakukan identifikasi dengan spektrometer inframerah. Dari spektrum inframerah dapat diamati adanya puncak yang kuat pada bilangan gelombang 3435 cm^{-1} . Ini menunjukkan adanya vibrasi ikatan O-H. Vibrasi ikatan O-H terjadi pada rentang bilangan gelombang $3200\text{-}3550 \text{ cm}^{-1}$. Pada

bilangan gelombang 1614 cm^{-1} juga muncul puncak yang menandakan adanya vibrasi ikatan C=O (Silverstein, 1998; Spectral Data Base System, 2005). Adanya ikatan O-H dan C=O semakin menguatkan dugaan bahwa isolat

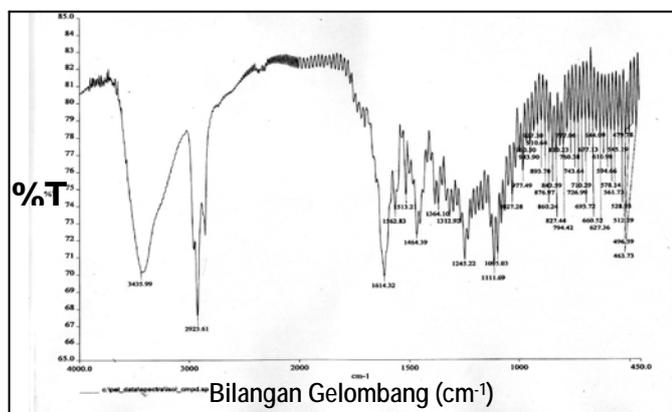
mengandung senyawa flavonol. Senyawa flavonol pada strukturnya terdapat gugus hidroksil (OH) dan karbonil (C=O). Spektrum inframerah isolat dapat dilihat pada Gambar 3.



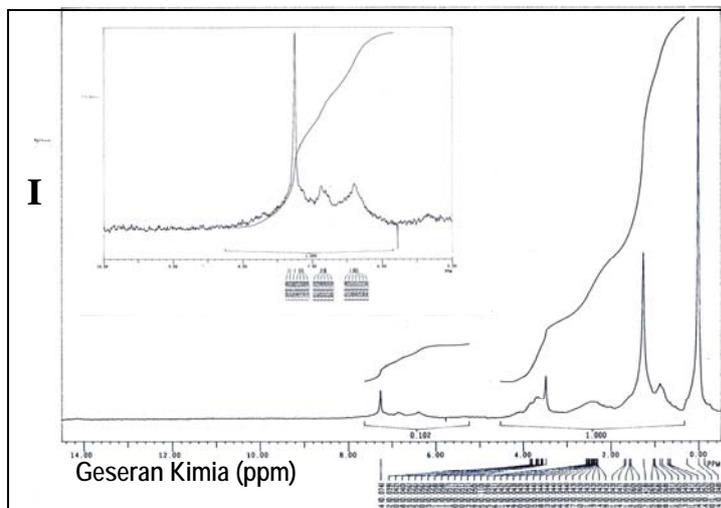
Gambar 1. Profil kromatogram KCKT isolat menggunakan kolom silika gel RP-18 dan fase gerak asetonitril : metanol : air (3 : 3 : 4) dideteksi pada λ 365 nm.



Gambar 2. Spektrum UV-Vis puncak kromatogram KCKT pada R_t 16 menit.



Gambar 3. Spektrum inframerah yang dibuat pelet KBr, menggunakan spektrometer FT-IR (Perkin Elmer)



Gambar 4. Spektrum RMI proton isolat dilarutkan dalam CDCl_3 menggunakan spektrometer FT-NMR (Hitachi R-1900).

Selanjutnya isolat diidentifikasi dengan menggunakan spektrometer resonansi magnetik inti. Hasilnya menunjukkan adanya dua puncak singlet pada geseran kimia (δ) 6,346-6,451 dan 6,805-6,871. Puncak-puncak ini menandakan adanya proton aril Ar-H. Pada spektrum resonansi magnetik inti, puncak dengan δ 1,257 menunjukkan adanya proton R-CH₂, demikian juga puncak pada δ 3,485 (Gambar 4). Menurut Hakim (1998) puncak-puncak δ 1,38 ; 1,57 ; 3,09 dan 5,09 merupakan ciri khas untuk gugus prenil. Oleh sebab itu ada kemungkinan senyawa flavonol di sini juga memiliki gugus prenil.

Berdasarkan hasil identifikasi KLT dengan penampak noda uap amonia, spektra UV-Vis, inframerah dan resonansi magnetik inti dapat disimpulkan bahwa isolat tersebut mengandung senyawa utama flavonoid jenis flavonol.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa isolat yang berasal dari ekstrak diklorometana kulit batang *A. champeden* Spreng. memiliki potensi sebagai antimalaria dengan nilai IC_{50} $0,024 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$ dan mengandung senyawa utama flavonol.

DAFTAR PUSTAKA

- Biagini G.A., O'Neill, P.M., Nzila, A., Ward, S.A. and Bray A.W., 2003. Antimalarial chemotherapy: young guns or back to the future, *Trend in Parasitology* **19** (11) : 479-487.
- Fidock D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R. and Nwaka S. *Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening* (supplementary document). [http://www.mmv.org/IMG/pdf/SCREEN_PDF.pdf]
- Hakim E.H., 1998. Artokarpin dan heteroflavanon-A, dua senyawa flavonoid bioaktif dari *Artocarpus champeden*, *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian ITB, Bandung.
- Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan. [<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS>] [diakses 6 Desember 2005]
- Marby T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. New York, 41-45.
- Markham K.R., 1988 (Terjemahan Padmawinata). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerbit ITB, Bandung, 38-53.

- Mulya M. dan Suharman, 1995. *Analisis Instrumental*. Airlangga University Press, 237.
- Mustofa, 2003. Molekul antimalaria alami: potensi dan tantangan pengembangannya sebagai obat baru malaria. *Majalah Obat Tradisional*, **8** (26).
- Noster S. and Kraus, I.J., 1990. In vitro antimalarial activity of *Cautarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extract on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica*, **56** (1) : 63-65.
- Parenti P., Pizzigoni, A., Hanozet, G., Hakim, E.H., Makmur, L., Achmad, S.A. and Giordana, B., 1988. A new prenylated flavone from *Artocarpus champeden* Spreng inhibit the K^+ -dependent amino acid transport in *Bombyx mori* midgut. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **244** (2) : 445-448.
- Silverstein R.M. and Webster, F.X., 1998. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley and Sons Inc., 87.
- Trager W. and Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **19** : 673-675.
- WHO 1985. Special programe for research and training in tropical disease research. TDR seventh program report malaria (2). *WHO Spec. Programe for Trop. Disease*, **2-13**.