

POTENSI EKSTRAK HEKSAN DAUN KAPUR (*Harmsioplanax aculeatus*, Harms) SEBAGAI OBAT ANTIMALARIA

Jusuf Salenus, Jefry Wijaya, Colincie Natalia
Labetubun, Stenly Erwin Belseran

Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas
Keguruan dan Ilmu Pendidikan,
Universitas Pattimura
email: ysallenus@yahoo.com

Abstract

Kapur plant (Harmsioplanax aculeatus, Harms) is traditionally used by Mollucans to treat malaria disease. Squeezed of young leaves which is dropped on the eye of sufferer is the way of its treatment. This research is aimed to assay haem polymerization inhibition activity, cytotoxic activity toward vero cells and to analysis chemical secondary metabolit of compound content on hexane extract of the old kapur leaves. Dried powder of kapur leaves (1 kg) is extracted by maceration technique using hexane solvent obtained 24.34g (2.43%) of hexane extract. Those extract which assayed haem polymerization inhibition on activity by Bassilico et al. (1998) method and cytotoxic test toward vero cells using MTT assay. Probit analysis has showing us that hexane extract of ripe kapur leaves were inhibit haem polymerization actively with IC50 in the amount 59.473 µg/mL and were not toxic toward normal cells with IC50 in the amount 1270.746 µg/mL. Phytochemical analysis by spray and visible reagent shown of steroid compound.

Keywords: *Harmsioplanax aculeatus Harms, haem polymerization inhibition activity, cytotoxic activity, vero cell, phytochemical*

1. PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, anak balita, ibu hamil, selain itu malaria secara langsung menyebabkan anemia dan dapat menurunkan produktivitas kerja (Direktorat PPBB, 2011).

Pada tahun 2010 diperkirakan 216 juta kasus malaria di seluruh dunia, dengan tingkat kematian 655 000 orang. Kematian di wilayah Afrika sebesar 91%, diikuti oleh wilayah Asia Tenggara 6%, dan daerah Mediterania Timur 3% (WHO, 2011). Di wilayah Asia Tenggara, Indonesia dilaporkan peringkat ketiga tertinggi jumlah kasus malaria, sebesar 229 819 kasus. Demikian pula, jumlah kematian sebesar 432 jiwa (WHO, 2012).

Salah satu kendala dalam penanggulangan malaria adalah adanya resistensi terhadap obat antimalaria yang digunakan (WHO, 2010). Timbulnya resistensi Plasmodium sp terhadap antimalaria mendorong para peneliti mencari antimalaria baru untuk menggantikan antimalaria yang tidak efektif lagi. Salah satu usaha menemukan antimalaria baru adalah melalui penelitian terhadap tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengobati malaria (Depkes RI dalam Suwandi, 2008). Banyak senyawa alam berhasil diisolasi dan dibuktikan aktivitas antiplasmodiumnya baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Senyawa-senyawa tersebut umumnya metabolit sekunder golongan alkaloid, terpen, kuasinoid, flavanoid, limonoid, kalkon, peptida, xanton, kuinon, kumarin, dan beberapa obat antimalaria bahan alam lainnya (Kaur et al dalam Mustofa, 2009). Obat antimalaria ideal harus memenuhi beberapa kriteria, salah satu kriteria adalah mempunyai efek samping ringan dengan toksisitas rendah sehingga tidak merugikan penderita (Mustofa, 2009).

Salah satu obat tradisional yang telah digunakan untuk mengobati malaria adalah tanaman *Harmsioplanax aculeatus* (Bl. Ex. DC) Harms. Oleh masyarakat Maluku tanaman ini disebut "pohon kapur" (Turalely, 2011). Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pada ekstrak metanol dan etil asetat daun kapur tua (*H. aculeatus*) (tidak terlalu muda / tidak terlalu tua, diambil 1 meter kedua dari pucuk muda) dan telah terbukti menghambat polimerisasi hem sebagai salah satu mekanisme aksi obat antimalaria dengan nilai IC50 sebesar 9410,93 µg/mL dan 556,157 µg/mL. Uji sitotoksik terhadap sel vero menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan etil asetat daun kapur tua tidak toksik terhadap sel normal dengan IC50 sebesar

9402,81 µg/mL dan 283,191 µg/mL. Serta Uji fitokimia memperlihatkan keberadaan senyawa flavanoid, fenolik, saponin dan antrakuinon (Wijaya dkk, 2013; Labetubun dkk, 2013).

Hasil penelitian Wijaya dkk (2013) dan Labetubun dkk (2013) menunjukkan aktivitas penghambatan polimerisasi hem yang baik dan tidak toksik terhadap sel normal. Namun sampai saat ini belum dilakukan pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi hem, uji sitotoksik terhadap sel vero serta analisis fitokimia pada ekstrak heksan daun kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms) yang sudah tua.

Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas penghambatan polimerisasi hem, uji sitotoksik terhadap sel vero serta analisis fitokimia pada ekstrak heksan daun kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms) yang sudah tua.

2. METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia FKIP UNPATTI, Laboratorium Kimia Organik FMIPA UNPATTI, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM mulai dari bulan 13 Februari 2014 sampai dengan 5 Juli 2014.

Bahan yang digunakan adalah daun kapur tua yang mengalami pematangan fisiologi (tidak terlalu muda / tidak terlalu tua) diambil 1 meter kedua dari pucuk muda, diperoleh dari desa Alang, Kabupaten Maluku Tengah. Kristal hematin, sel vero yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, media M199 dan mikroplate dengan 96 sumuran (IWAKI).

Bahan kimia yang digunakan adalah n-heksan, kloroform, etil asetat berderajat analisis (Merck KGaA), DMSO (Schuchardt OHG Merck), asam asetat glasial (E. Merck), NaOH (E. Merck), MTT, SDS 10%, lempeng lapis tipis silika gel 60 F254, HCl (E. Merck), serbuk Zn, reagen Dragendorff, Wagner, Mayer, FeCl₃, Liebermann-Burchard, dan KOH alkoholis.

Peralatan yang digunakan adalah rotary evaporator (B'U'CHI Switzerland R-215),

neraca analitis (OHAUS AR2140), sentrifuse (Eppendorf, Centrifuge 5415 D), mikroskop inverter (Olympus CKX 41), inkubator CO₂ (Model 6200, NAPCO), LAF (Delta Series), ELISA Reader (Bio Rad), dan lampu UV 365nm.

Pembuatan Ekstrak Heksan Daun Kapur Tua

Pengumpulan dan pengeringan bahan

Bahan tanaman yang diambil adalah daun segar yang sudah tua dari tanaman kapur (*H. aculeatus*) yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan dilanjutkan dengan dipanaskan di oven pada suhu 40°C selama 6 jam. Daun kapur kemudian dibuat serbuk menggunakan blender dan ditimbang untuk mengukur kadar airnya.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{massa awal} - \text{massa konstan}}{\text{massa awal}} \times 100\% \quad (1)$$

Pembuatan ekstrak

Sebanyak 1 kg serbuk daun kapur diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan 3000 mL pelarut heksan, dilakukan 2x24 jam dibantu dengan *shaker*. Pelarut diuapkan menggunakan *Rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian diuapkan pelarutnya dibantu dengan menggunakan hairdryer pada suhu 50°C selama 1 jam dan didinginkan di dalam desikator dan ditimbang hingga konstan.

Rendemen ekstrak heksan daun kapur tua ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{massa ekstrak yang diperoleh}}{\text{massa sampel yang digunakan}} \times 100\% \quad (2)$$

Uji Penghambatan Polimerisasi Hem

Pembuatan kurva standar hematin

Larutan hematin dengan seri konsentrasi 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; dan 0,16 mM dalam NaOH 0,2M dibuat secara *two fold dilution*. Sebanyak 100 µL larutan hematin direaksikan dengan 50 µL asam asetat glasial 100% dan untuk tiap konsentrasi dibuat triplikat. *Eppendorff* yang telah berisi larutan tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, *eppendorff* disentrifugasi dengan kecepatan

8000 rpm selama 10 menit kemudian dicuci dengan DMSO sebanyak tiga kali.

Endapan kristal hematin yang diperoleh dilarutkan dengan 200 µL NaOH 0,1M. Sejumlah 100 µL larutan tersebut dipindahkan ke *microplate* 96 sumuran dan dibaca nilai absorbansinya dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dan nilai konsentrasi β-hematin diplot ke regresi linear sehingga diperoleh persamaan regresi linear yang akan menjadi acuan untuk menghitung konsentrasi β-hematin yang terbentuk dalam tiap bahan uji.

Uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem

Uji penghambatan polimerisasi hem dilakukan terhadap ekstrak heksan daun kapur (*H. aculeatus*) dengan menggunakan metode yang dikemukakan oleh Bassilico *et al.* (1998) yang dimodifikasi. Sebanyak 100 µL larutan hematin 1 mM dalam NaOH 0,2 M dan 50 µL bahan uji dimasukkan ke dalam tabung *ependorf*, kemudian ditambahkan 50 µL asam asetat glasial 100%.

Bahan uji yang digunakan dibuat dalam berbagai konsentrasi 125; 62,5; 31,25; 15,625 dan 7,8125 µg/mL dan untuk setiap konsentrasi dibuat triplikat. Untuk kontrol negatif digunakan aquades sebagai pengganti senyawa uji dan kontrol positif digunakan klorokuin konsentrasi 4000; 2000; 1000; dan 500 µg/mL. *Eppendorff* yang telah berisi larutan tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah inkubasi, *eppendorff* disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit kemudian dicuci dengan DMSO sebanyak tiga kali. Endapan kristal hematin yang diperoleh dilarutkan dengan 200 µL NaOH 0,1M. Sejumlah 100 µL larutan tersebut dipindahkan ke *microplate* 96 sumuran dan dibaca nilai absorbansinya dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh diplot ke persamaan garis regresi linear kurva standar sehingga dapat ditentukan konsentrasi β-hematin bahan uji pada setiap sumuran.

Presentase penghambatan polimerisasi hem dihitung dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{[\beta\text{-hematin}]_{\text{kontrol negatif}} - [\beta\text{-hematin}]_{\text{bahan uji}}}{[\beta\text{-hematin}]_{\text{kontrol negatif}}}$$

$$\times 100\% \quad (3)$$

Aktivitas penghambatan polimerisasi hem dinyatakan dengan dalam nilai IC₅₀ yaitu kadar yang mampu menghambat polimerisasi hem hingga 50%. Nilai IC₅₀ diperoleh berdasarkan hasil analisis regresi probit pada SPSS.

Uji Sitotoksik

Sifat sitotoksik ekstrak heksan daun kapur diujikan pada sel vero. Sel vero dikultur menggunakan media M₁₉₉ yang telah ditambahkan 10% FBS, 2% penisilin-streptomisin dan 0,5-1% fungison. Sel vero diambil dari nitrogen cair, dihangatkan pada suhu 37°C sampai cair. Suspensi sel yang telah cair dimasukkan ke dalam *conical tube* dan dicuci dengan medium komplit M₁₉₉. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *flask* kultur dan diinkubasikan dalam inkubator 37°C, 5% CO₂.

Pertumbuhan sel diamati setiap hari dengan mikroskop inverted sampai sel hampir memenuhi dinding dasar *flask*. Panen sel vero dilakukan setelah sel hampir memenuhi dinding *flask*. Sel dicuci dengan PBS dan ditambahkan dengan tripsin 0,25% agar sel terlepas dari dinding *flask*. Suspensi sel dibuat dengan menambahkan medium komplit, setelah itu jumlah sel dihitung dengan *haemocytometer*.

Untuk menentukan toksisitas ekstrak secara *in vitro* dilakukan dengan metode MTT. Sel dimasukkan ke dalam *microplate* 96-well dengan kepadatan 2x10⁴ sel/well dalam 100µL. Kemudian medium kultur yang mengandung ekstrak untuk tiap variasi konsentrasi ditambahkan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 4000; 2000; 1000; 500; 250; dan 125 µg/mL dan untuk setiap konsentrasi dibuat triplikat.

Kultur sel dan ekstrak kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C, 5% CO₂. Pertumbuhan sel diamati menggunakan MTT yang selanjutnya dibandingkan dengan kultur (tanpa ekstrak sebagai bahan uji). Medium dibuang setelah massa inkubasi berakhir kemudian ditambahkan kembali 100 µL medium komplet dan 10 µL larutan MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator pada suhu 37°C, 5% CO₂. Selanjutnya 100 µL SDS 10% dalam HCl 0,01 M ditambahkan untuk melarutkan

formazan yang terbentuk dan dinkubasi *overnight* pada suhu kamar. Hasil pengujian dibaca dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Golongan Senyawa dalam Ekstrak Heksan Daun Kapur Tua

Larutan ekstrak heksan daun kapur tua ditotolkan pada 4 lempeng lapis tipis silika gel 60 F₂₅₄ berukuran 2x8 cm dan dielusi menggunakan eluen n-heksan : kloroform (1 : 9). Tiap noda yang diperoleh setelah dielusi kemudian disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan dilanjutkan dengan H₂SO₄ 5% etanolik, adanya alkaloid ditunjukkan dengan diperoleh noda cokelat pada kromatogram. Pengujian alkaloid juga dilakukan dengan cara, sebanyak 2 mL ekstrak heksan daun kapur tua dilarutkan dengan pereaksi Meyer dan pereaksi Wagner, adanya alkaloid ditunjukkan melalui adanya endapan putih dengan pereaksi Mayer dan endapan cokelat dengan pereaksi Wagner (Wagner *et al.*, 1984; Simbala, 2009).

Pengujian fenolik dilakukan dengan cara 2 mL ekstrak heksan daun kapur tua dilarutkan dengan 2 mL FeCl₃ 1%, adanya fenolik menimbulkan warna hijau, merah ungu, biru atau hitam yang kuat (Harbone, 1987). Pengujian steroid dilakukan dengan cara disemprotkan kromatogram hasil KLT dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan dilanjutkan dengan pemanasan di oven pada suhu 100°C selama 10 menit, adanya steroid ditunjukkan dengan diperoleh noda berwarna hijau-biru pada kromatogram (Wagner *et al.*, 1984; Harbone, 1987). Pengujian antrakuinon dilakukan dengan cara disemprotkan kromatogram hasil KLT dengan KOH 5%, adanya antrakuinon ditunjukkan dengan diperoleh noda berwarna merah pada kromatogram (Wagner *et al.*, 1984; Harbone, 1987).

Pengujian saponin dilakukan dengan mengocok 2 mL ekstrak heksan daun kapur tua dalam 2 mL aquades (65°C) di dalam tabung reaksi, timbulnya busa menunjukkan adanya saponin (Harbone, 1987). Pengujian flavanoid dilakukan dengan cara 2 mL ekstrak heksan daun kapur tua dilarutkan dalam 2 mL HCl 2N dan ditambahkan serbuk Zn, adanya flavanoid ditunjukkan melalui perubahan

warna oranye ketika dikocok (Adfa, 2005; Hanani dkk, 2005).

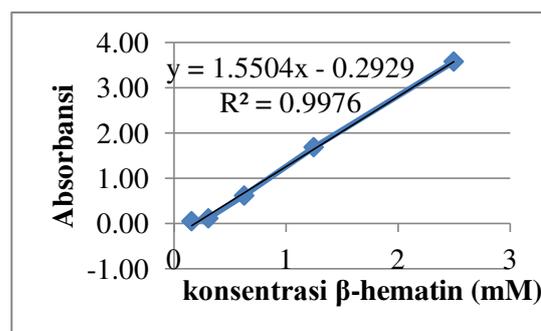
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Kadar Air dan Ekstraksi Serbuk Daun Kapur Tua

Kadar air yang diperoleh dari daun kapur tua sebesar 71,54%. Ekstraksi serbuk daun kapur (*H. acuelatus*) tua secara maserasi menggunakan pelarut n-heksan. Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa 1 kg serbuk kering daun kapur tua diperoleh: 24,34g ekstrak berwarna hijau kehitaman, berbentuk pasta, dan memiliki rendemen sebesar 2,43%.

Penentuan kadar air dimaksudkan untuk menyatakan kandungan zat dalam tumbuhan sebagai persen bahan kering dan untuk mengetahui ketahanan suatu bahan dalam penyimpanan (Harjadi, 1993). Menurut Pramono (2005) dalam (Ma'mun, dkk, 2006) jika kadar air dalam bahan masih tinggi dapat mendorong enzim melakukan aktifitasnya mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain yang mungkin tidak lagi memiliki efek farmakologi seperti senyawa aslinya.

Hal ini tidak akan terjadi jika bahan yang telah dipanen segera dikeringkan sehingga kadar airnya rendah. Beberapa enzim perusak kandungan kimia yang telah lama dikenal antara lain hidrolase, oksidase dan polimerase. Air harus dihilangkan agar dapat memperpanjang masa simpan suatu bahan. Tingginya kadar air pada tanaman ini kemungkinan karena adanya proses fotosintesis.



Gambar 1. Kurva Standar Hematin

Tabel 1. Pengaruh Pemberian Ekstrak Heksan Daun Kapur (*H. acuelatus*) Tua Terhadap Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem

Bahan Uji	Konsentrasi (µg/mL)	Rerata kadar β-hematin	Rerata Persen Penghambatan	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak heksan	125	0,4090	68,4903	59,473
	62,5	0,6497	57,6863	
	31,25	1,3400	26,6958	
	15,625	1,5837	15,7571	
	7,8125	1,6710	11,8365	
Kontrol positif	4000	0,4329	69,8670	1016,72
	2000	0,5920	58,7936	
	1000	0,7711	46,3286	
	500	0,8238	42,6624	
Kontrol negatif		1,4368		

Tabel 2. Nilai IC₅₀ Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Ekstrak Etil Asetat dan Ekstrak Metanol

Bahan Uji	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak etil asetat*	556,157
Ekstrak metanol**	9410,93

(Sumber: *Labetubun, dkk., 2013; **Wijaya, dkk., 2013).

Uji Penghambatan Polimerisasi Hem Daun Kapur Tua

Hasil uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem ekstrak heksan daun kapur (*H. acuelatus*) tua. Kadar β-hematin dari sampel uji maupun kontrol diperoleh dengan cara memasukkan harga absorbansi masing-masing bahan uji dan kontrol tersebut ke dalam persamaan kurva standar hematin yaitu: $y = 1,5504x - 0,2929$ dengan y adalah absorbansi dan x adalah kadar β-hematin. Nilai $R^2 = 0,9976$ (Gambar. 1). Analisis probit menunjukkan bahwa IC₅₀ adalah 59,473 µg/mL dan nilai kontrol positif (klorokuin) adalah 1016,72 µg/mL seperti terlihat pada Tabel 1.

Kemampuan suatu antiplasmodium dalam menghambat polimerisasi hem berhubungan langsung dengan kemampuannya sebagai antimalaria, walaupun diketahui bahwa mekanisme kerja antiplasmodium tidak hanya melalui penghambatan polimerisasi hem. Aktivitas

penghambatan polimerisasi hem sebenarnya merupakan kerja satu atau dua mekanisme, yaitu (1) terjadi interaksi antara senyawa terpenoid, fenol dan sterol dengan sistem elektronik hem, (2) ekstrak-ekstrak ini terdiri dari senyawa-senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang dapat berikatan dengan ion besi hem (Basilico, *et al.*, 1998; Syarif, 2007). Berdasarkan hal tersebut, mekanisme kerja ekstrak heksan daun kapur tua (*H. aculeatus*) dalam menghambat polimerisasi hem adalah berinteraksinya senyawa steroid dengan sistem elektronik hem dan gugus hidroksil yang berikatan dengan ion besi hem.

Uji ini merupakan reaksi kimiawi model dengan meniru suasana pada sel hidup (eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* sp). Pada sel hidup banyak faktor lain yang mempengaruhi aktivitas antiplasmodium, misalnya kelarutan obat dalam lemak yang akan mempengaruhi absorpsi dan penetrasi obat ke dalam eritrosit dan parasit. Pada reaksi kimiawi hal ini tidak terjadi. Ada faktor lain yang juga berpengaruh pada uji dengan menggunakan metode ini. Faktor tersebut adalah warna dan pH ekstrak. Pencucian yang tidak bersih akan mempengaruhi absorbansi yang diukur pada Elisa Reader.

Reaksi kimia terbentuknya kristal hematin membutuhkan pH yang rendah, sedangkan pH ekstrak yang mungkin tinggi akan meningkatkan pH sehingga kristal hematin tidak terbentuk. Kesemua faktor ini

akan mempengaruhi hasil pembacaan pada Elisa Reader (Suwandi, dkk., 2008).

Baelsman *et al.* (2000) dalam (Suwandi, dkk., 2008) menyebutkan jika IC50 yang didapat dari uji penghambatan polimerisasi pada kloroquinsulfat lebih dari 37,5 mM (12.000 µg/mL) maka dapat dikategorikan tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Berdasarkan kriteria ini maka ekstrak heksan daun kapur tua dapat dikatakan memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem.

Jika dibandingkan dengan nilai IC50 kontrol positif (klorokuin), ekstrak heksan daun kapur tua memiliki nilai IC50 yang lebih kecil. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak heksan daun kapur tua memiliki aktivitas

yang lebih besar dalam menghambat polimerisasi hem daripada klorokuin. Sedangkan jika dibandingkan IC50 ekstrak heksan dengan penelitian sebelumnya oleh Wijaya, dkk., 2013 dan Labetubun, dkk., 2013 yang diuji pada ekstrak metanol dan etil asetat, ekstrak heksan daun kapur tua memiliki aktivitas yang lebih baik menghambat aktivitas polimerisasi hem dibandingkan ekstrak metanol dan etil asetat.

Uji Aktivitas Sitotoksik Daun Kapur Tua

Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak heksan daun kapur tua adalah 1270,746 µg/mL seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Presentase Kehidupan Sel Vero pada Pemberian Ekstrak Heksan Daun Kapur Tua (*H. acuelatus*) pada Inkubasi 24 Jam

Bahan	Konsentrasi (µg/mL)	Presentase Kehidupan Sel Vero inkubasi 24 jam (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak heksan	4000	1,519	1270,746
	2000	1,575	
	1000	95,633	
	500	95,689	
	250	96,081	
	125	99,888	

Tabel 4. Nilai IC₅₀ Uji Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat dan Ekstrak Metanol pada Sel Vero.

Bahan	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak etil asetat*	283,191
Ekstrak metanol**	9402,81

(Sumber: *Labetubun, dkk., 2013; **Wijaya, dkk., 2013).

Penggunaan kultur sel semakin disukai untuk keperluan uji sitotoksitas karena berbagai alasan diantaranya mampu menurunkan biaya percobaan dibandingkan penggunaan hewan uji dan mekanisme toksisitas yang dapat dikerjakan jauh lebih efektif karena lingkungan sel lebih mudah dikontrol. Pengembangan metode in vitro sebagai alternatif pengganti uji dengan menggunakan hewan uji mempunyai relevansi yang cukup baik terutama yang bertujuan untuk mendeteksi potensi suatu obat pada manusia (Wahyudi dan Djajanegara, 2009).

Uji sitotoksitas pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksisitas ekstrak heksan daun kapur tua pada sel normal. Sel normal yang dipakai dalam penelitian ini adalah sel vero. Sel vero merupakan sel yang berasal dari sel epitel ginjal dari Monyet Hijau Afrika (*Cercopithecus aethiops*). Medium yang digunakan untuk mengkultur sel vero adalah media M199, media ini berguna untuk memberikan nutrisi yang dibutuhkan sel, supaya sel dapat bertahan hidup dan dapat memperbanyak diri.

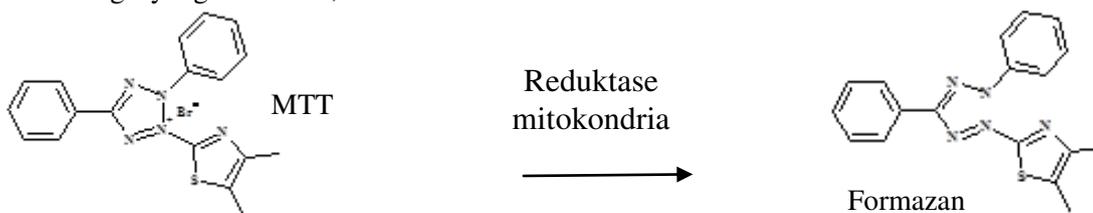
Uji sitotoksitas dengan metode tidak langsung dilakukan dengan metode MTT. Sel hidup akan mengubah garam tetrazolium (3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetralolium bromida) (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam SDS 10% berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000). Penambahan SDS 10% dalam HCl 0,01 M bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik dan melarutkan formazan sehingga warna ungu formazan dapat dibaca absorbansinya secara spektrofotometri dengan ELISA reader.

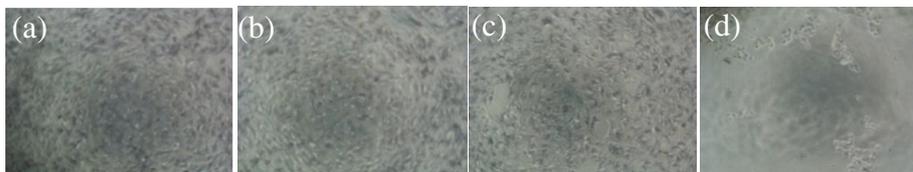
Absorbansi tersebut menggambarkan jumlah sel hidup. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, absorbansi akan

semakin tinggi, hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak MTT yang diabsorpsi ke dalam sel hidup sehingga formazan yang terbentuk juga semakin banyak, absorbansi ini yang digunakan untuk menghitung presentase sel hidup sebagai respon (Sieuwerts et al.,1995).

Jika dibandingkan IC_{50} ekstrak heksan dengan penelitian sebelumnya oleh Labetubun, dkk., 2013 dan Wijaya, dkk., 2013 yang diuji pada ekstrak metanol dan etil asetat, ekstrak heksan daun kapur tua memiliki efek toksik yang lebih rendah terhadap sel vero dibandingkan etil asetat.



Gambar 2. Reaksi Reduksi MTT Menjadi Formazan



Gambar 3. Sel vero setelah pemberian MTT, (a) pada kontrol sel; pada konsentrasi sampel (b) 62,5 µg/mL; (c) 1000 µg/mL; (d) 8000 µg/mL.

Tabel 5. Hasil Analisis Fitokimia

Golongan Senyawa Metabolit Sekunder	Jenis pereaksi	Hasil
Alkaloid	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-
Flavanoid	Shinoda Test	-
Fenolik (Polifenol)	FeCl ₃ 1 %	-
Steroid	Lieberman-Burchard	+
Saponin	Tes buih	-
Antrakuinon	5% KOH Alkoholis	-

Uji Fitokimia

Analisis fitokimia ekstrak heksan daun kapur tua menggunakan berbagai pereaksi kimia untuk menguji golongan senyawa metabolit sekunder. Hasil yang diperoleh seperti pada Tabel 5.

Uji fitokimia ekstrak heksan daun kapur tua dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun kapur dan menjadi studi awal untuk mencari dan menemukan *lead compound* (senyawa penuntun/senyawa aktif) yang akan dipakai sebagai antimalaria

(Harbone, 1987; Turalely, 2012). Berdasarkan Tabel 5, ekstrak heksan mengandung senyawa metabolit sekunder golongan steroid.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Ekstrak heksan daun kapur tua aktif menghambat polimerisasi hem dengan IC_{50} sebesar 59,473 $\mu\text{g/mL}$.
2. Ekstrak heksan daun kapur tua tidak toksik terhadap sel normal dengan IC_{50} sebesar 1270,746 $\mu\text{g/mL}$.
3. Ekstrak heksan daun kapur tua mengandung golongan senyawa steroid.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini, Ibu Rachel Turalely, S.Pd., M.Biotech yang telah membimbing kami dan kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

5. REFERENSI

Adfa, M. (2005). Survey Etnobotani, Studi Senyawa Flavanoid dan Uji Brine Shrimp Beberapa Tumbuhan Obat Tradisional Suku Serawai di Propinsi Bengkulu. *Jurnal Gradien*, 1(1): 43-50.

Basilico N, Pagani E, Monti D, Oliario P and Taramelli D. 1998. A Microtitre based Method for Measuring the Haem Polymerization Inhibitory Activity (HPIA) of Antimalarial Drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 55-60.

Direktorat Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang. 2011. *Epidemiologi Malaria di Indonesia, dalam Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan, Triwulan I*. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Hlm 1-16.

Doyle, A, dan Griffiths, JB. 2000. *Cell and Tissue Culture For Medical Research*. New York: John Wiley and Sons Ltd.

Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R. (2005). Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia Sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3): 127-133.

Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan terbitan kedua*. Diterjemahkan oleh Padmawinata K dan Soediro I. Bandung: Penerbit ITB. Hlm 8-9, 19-20, 49, 147, 155.

Harjadi W. 1993. *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Jakarta: Gramedia.

Labetubun CN, Sapulette VM, Sohuwat O. 2013. Potensi Ekstrak Etil Asetat Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus*, Harms) Sebagai Obat Antimalaria. Laporan Akhir PKM-P. Ambon: Universitas Pattimura.

Ma'mun, Suhirman S, Manoi F, Sembiring BS, Tritianingsih, Sukmasari M. Gani A, Tjitjah F, dan Kustiwa D. 2006. *Teknik Pembuatan Simplisia dan Ekstrak Purwoceng*. Laporan Pelaksanaan Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.

Mustofa. 2009. *Obat Antimalaria Baru: Antara Harapan dan Kenyataan*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran. Yogyakarta:

Sieuwerts, Anieta M, et al. 1995. The MTT Tertazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC_{50} -Values and Cell Survival. *Eur J Clin ChemBiochem.* 33: 813-823.

Simbala HEI. 2009. Analisis Senyawa Alkaloid Beberapa Jenis Tumbuhan Obat Sebagai Bahan Aktif Fitofarmaka. *Pasific Journal*, 1(4): 489-494.

Suwandi JF. 2007. Aktivitas Antiplasmodium Ekstrak Daun Sungkai (*Peronema canescens*): Kajian aktivitas antiplasmodium *in vitro* dan *in vivo*, aktivitas penghambatan polimerisasi hem dan aktivitas sitotoksik terhadap sel vero. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Suwandi JF, Wijayanti MA, Mustofa. 2008. *Aktivitas Penghambatan Polimerisasi*

- Hem Antiplasmodium Ekstrak Daun Sungkai (Peronema canescens) In Vitro*. Prosiding. Lampung: Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II, Universitas Lampung. IV:113-120.
- Syarif RA. 2007. Aktivitas Antiplasmodium Fraksi Larut Eter Ekstrak Metanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) Pada *Plasmodium falciparum* secara *In vitro*. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Turalely R. 2011. Fraksi Antiplasmodium Paling Aktif Dari Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus* Harms) Dan Identifikasi Beberapa Kandungan Senyawanya Menggunakan GC-MS. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. Hlm 23-25, 69.
- Turalely R. 2012. Uji Sitotoksik Serta Aktivitas Antiplasmodium In Vitro Pada Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus*, Harms) Paling Aktif. Ambon: Lembaga Penelitian Universitas Pattimura.
- Wagner H., Bladt S., Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis*. (Tranlated by Scott A). German: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wahyudi P dan Djajanegara I. 2009. Pemakaian Sel HeLa Dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Ethanol Kulit Batang Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Jurnal Biotika* Vol. 7 No. 2: 52-60
- WHO. 2010. Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Hlm 9.
- WHO. 2011. *World Malaria Report : 2011*. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Hlm 66.
- WHO. 2012. *Disease Burden in SEA Region*. diakses dari http://www.searo.who.int/LinkFiles/Malaria_in_the_SEAR_Map_SEAR_Endemicity_10.pdf, pada tanggal 21 Maret 2012.
- Wijaya J, Salenussa J, Marantika J. 2013. Potensi Ekstrak Metanol Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus*, Harms) Sebagai Obat Antimalaria. Laporan Akhir PKM-P. Ambon: Universitas Pattimura.