

UJI ANTIMALARIA EKSTRAK SPONS *Xestospongia* sp. TERHADAP *Plasmodium* sp. SECARA *IN VITRO*

Sri Wahyuningsih*¹, Nurhikma Awaluddin²

Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Megarezky

Jl. Antang Raya No. 43 Makassar

*E-mail: sriwahyuningsih1004@gmail.com

Abstrak

Penelitian uji antimalaria ekstrak spons *Xestospongia* sp. telah dilakukan terhadap *Plasmodium* sp. secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui penghambatan ekstrak spons *Xestospongia* sp. terhadap *Plasmodium falciparum* berdasarkan nilai IC₅₀. Uji antimalaria ekstrak spons *Xestospongia* sp. menggunakan lempeng sumur mikro, dimana kontrol berisi medium dan ± 50 µl suspensi parasit dan yang lain ditambahkan ekstrak dengan masing-masing konsentrasi 0,1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml. Pengamatan pengujian setelah 48 jam dan 72 jam dengan melihat jumlah eritrosit yang terinfeksi pada mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan penghambatan yaitu konsentrasi 0,1 µg/ml, 15.67%; konsentrasi 1 µg/ml, 24.83%; konsentrasi 10 µg/ml, 45,50%; konsentrasi 100 µg/ml, 54.17; dan konsentrasi 1000 µg/ml, 68.00%. Aktivitas antimalaria berdasarkan nilai IC₅₀. Pada penelitian ini diketahui bahwa nilai IC₅₀ sebesar 46.51 µg/ml yang berarti ekstrak spons *Xestospongia* sp. berpotensi aktif sebagai antimalaria.

Kata kunci : Spons *Xestospongia* sp.; antimalaria

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit infeksi yang disebabkan beberapa protozoa dengan genus *Plasmodium* adalah malaria. *Plasmodium falciparum* menjadi parasit penyebab dengan kasus yang parah dan fatal (Fattorusso dan Scafati, 2009). Penularan parasit malaria disebabkan oleh nyamuk *Anopheles* betina. Parasit kemudian berkembang biak dalam sel darah merah (RBC) yang menyebabkan gejala seperti demam, menggigil, mual, dan seperti flu, tetapi yang parah pada kasus seperti koma dan kematian (Mudi dan Muhammad, 2009).

Jumlah parasit *Plasmodium* dalam tubuh dapat menyebabkan berat ringan infeksi yang akan terlihat dari demam periodik, splenomegali, dan anemia (Harijanto, 2009). Siklus hidup, mekanisme pertahanan imunologi, dan klinis pengembangan malaria pada manusia adalah proses yang kompleks. Infeksi *Plasmodium falciparum* dapat menimbulkan efek serius, misalnya anemia, komplikasi otak (hingga koma), hipoglikemia dan glomerulonephritis (Kaur et. al,2009).

Timbulnya kasus multiresistensi terhadap senyawa antimalaria menyebabkan permasalahan dalam penyakit infeksi (Nofiani dkk, 2009). Hal ini mendorong para peneliti agar

mencari antimalaria baru untuk menggantikan antimalaria yang tidak efektif lagi (Depkes RI, 2006). Peneliti kemudian beralih pada biota laut yang menyediakan beragam bahan alam dari invertebrata laut misalnya spons, tunikata, bryozoa, dan moluska (Donia dan Hamann, 2003).

Salah satu biota laut adalah spons. Spons diketahui memiliki banyak manfaat bagi ahli kimia (Joseph dan Sujatha, 2011). Spons laut memiliki potensi sebagai obat untuk penyakit seperti malaria, kanker dan penyakit yang diakibatkan oleh virus (Ravichaddran et. al, 2009). Salah satu contoh, spons laut dari genus *Xestospongia* (Haploscleridae, Petrosiidae) telah terbukti menjadi sumber yang kaya akan metabolit bioaktif sekunder seperti alkaloid (xestospongins/araguspongines, aaptamines, manzamines, ingenamines, dan renieramicins), polisiklik kuinon, aminoalkohol, senyawa heterosiklik dan sterol (aragusterol). Beberapa senyawa menunjukkan bioaktivitas sitotoksik, antimikroba, antiplasmodium, atau aktivitas vasodilator (Lauren et. al, 2006). *Xestospongia* dilaporkan mengandung xestosaprol D dan E untuk bahan obat-obatan. Selain itu, spons laut

Xestospongia sp., kelas Demospongiae, ordo Haplosclerida, dan family Nepheliospongiidae terbukti mengandung antimalaria. Spesies ini mengandung senyawa aktif terhadap malaria yaitu protein kinase yang diyakini dapat menghambat *Plasmodium falciparum* (Lauren et. al, 2006).

Spesies *Xestospongia* lainnya (*Xestospongia muta* dan *Xestospongia testudinaria*) diketahui dapat memproduksi varietas dari rantai lurus senyawa acetylenat, yang menunjukkan bioaktivitas antimikroba dan sitotoksik.

Dari uraian di atas, genus *Xestospongia* yang telah banyak diteliti kandungan bioaktif malariannya maka permasalahan yang timbul yaitu apakah ekstrak metanol spons *Xestospongia* sp. sebagai salah satu spesies dari *Xestospongia* mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium* sp. secara *in vitro*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui penghambatan ekstrak metanol spons *Xestospongia* sp. terhadap *Plasmodium* sp. secara *in vitro* berdasarkan pada nilai IC50. Dengan penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan yang diperoleh dari senyawa kimia pada spons laut serta dapat memaksimalkan pemanfaatan seluruh senyawa kimia pada spons laut yang ada.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Pelaksanaan penelitian di laboratorium farmasi Universitas Megarezky pada bulan Mei - Oktober 2019.

Populasi dan sampel

Sampel adalah ekstrak spons *Xestospongia* sp. berasal dari Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

Alat dan bahan

Alat - alat digunakan adalah alat gelas, autoklaf, *conical tube*, desikator, filter 0,22, inkubator, mikroplate 96 sumuran, mikroskop, mikropipet, tabung effendorf, rotavapor, sentrifuge, spoit dan timbangan analitik.

Bahan-bahan digunakan adalah aquadestilata, ekstrak spons *Xestospongia* sp., darah golongan "O", etanol 70%, hipoxantin, minyak emersi, metanol, natrium bikarbonat 5%, pewarna Giemsa, *Plasmodium* sp., Rosewell Part Memorial Institute (RPMI) 1640, gentamisin sulfat, serum manusia, sorbitol 5%.

Prosedur kerja

1. Pengambilan dan pengolahan sampel

Sampel spons diambil dalam laut kemudian dicuci bersih-bersih dengan air laut. Setelah bersih, sampel dipotong-potong kecil dan ditimbang untuk ekstraksi. Sampel diekstraksi secara maserasi menggunakan metanol, disimpan selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah itu disaring kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer*.

2. Pembuatan bahan penelitian

a. Pembuatan Medium Stok

RPMI 1640 sebanyak 500 ml ditambahkan gentamisin sulfat. Medium stok difilter dan disimpan suhu 4 °C

b. Pembuatan Medium Transport

Medium stok sebanyak 50 ml ditambah larutan NaHCO₃ 5%. Medium transport difilter dan disimpan pada suhu -25 °C.

c. Pembuatan Medium Lengkap

Medium transport ditambahkan serum golongan darah O. Larutan difilter dan disimpan pada suhu -25 °C.

d. Pembuatan *growth medium* (medium GM)

Medium transport ditambahkan hipoxantin. Larutan difilter dan disimpan pada suhu -25 °C.

e. Pembuatan RBC 50%

Darah "O" sebanyak 10 ml disentrifuge 1500 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, darah yang tertinggal dicuci dengan medium transport sebanyak dua kali. Packed cell dan medium disuspensikan ke dalam medium lengkap dengan perbandingan volume 1:1. Suspensi ini disimpan pada suhu 4°C dan tiap seminggu sekali perlu pengantian medium lengkap.

f. Perhitungan persentase parasitemia

Persen parasitemia yang terkandung dalam biakan diamati melalui slide apusan darah tipis. Slide diamati dengan mikroskop pada pembesaran 10 x 10

3. Pengujian antimalaria secara in vitro

Parasit dengan kadar parasitemia 1% dikumpulkan setelah hasil sinkronisasi selama 48 jam. Parasit diambil dengan cara disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm, supernatan dibuang dengan mikropipet dan dihitung sisa endapan. Jika volume endapan sebanyak 0,2 ml maka ditambahkan dengan *growth medium* (GM) sampai 10 ml. Pada *conical tube* lain disiapkan RBC 50% sebanyak 0,4 ml dan ditambahkan *growth medium* (GM) sampai 10 ml. Dicampur sampai homogen, dan dilakukan uji aktivitas antimalaria. Uji aktivitas antimalaria dilakukan tiga kali dengan tiga kali replikasi, memakai lempeng sumur mikro.

- Kelompok A, kelompok kontrol
- Kelompok B, ekstrak uji dengan konsentrasi 1000 µg/ml
- Kelompok C, ekstrak uji dengan konsentrasi 100 µg/ml
- Kelompok D, ekstrak uji dengan konsentrasi 10 µg/ml
- Kelompok E, ekstrak uji dengan konsentrasi 1 µg/ml
- Kelompok F, ekstrak uji dengan konsentrasi 0,1 µg/ml

4. Pemanenan dan evaluasi hasil pengujian antimalaria

Lempeng sumur mikro dikeluarkan dari inkubator dan desikator. Suspensi bagian atas dibuang 20 µl sehingga yang tertinggal hanya suspensi yang lebih pekat. Suspensi tersebut diambil 5 µl dengan mikropipet selanjutnya diteteskan pada slide mikroskop, untuk dibuat slide apusan darah tipis. Dihitung persentase penghambatan parasit.

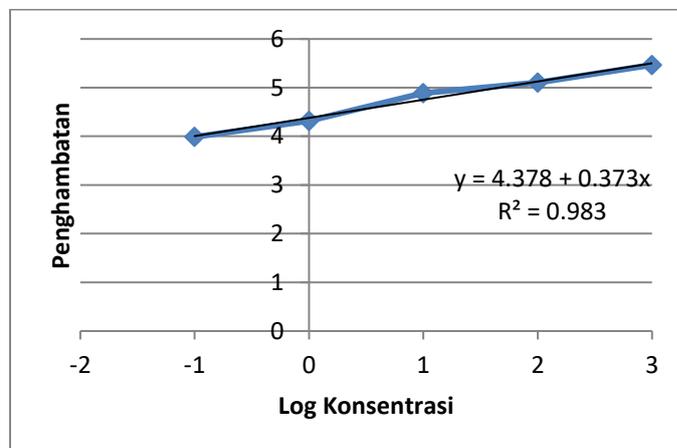
Analisis data

Data yang diamati dalam penelitian adalah persen penghambatan setelah pemberian ekstrak metanol spons *Xestospongia* sp. Aktivitas antimalaria diketahui dengan mendapatkan nilai IC₅₀ dengan cara melakukan analisis probit. Analisis probit ini dilakukan dengan melihat hubungan antara nilai probit penghambatan dan log konsentrasi sehingga diperoleh nilai IC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian ekstrak spons *Xestospongia* sp. dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan konsentrasi 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml. Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak metanol spons *Xestospongia* sp. terhadap penghambatan *Plasmodium* sp. secara *in vitro*.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi menunjukkan efek penghambatan tertinggi setelah inkubasi 72 jam dibandingkan 48 jam. Presentase penghambatan setelah 72 jam pada masing-masing konsentrasi 0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml; dan 1000 µg/ml yaitu 15.67%; 24.83%; 45.50%; 54.17%; dan 68.00%. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi uji sampel semakin tinggi maka penghambatan terhadap *Plasmodium falciparum* juga semakin tinggi.



Gambar 1. Grafik linier penghambatan ekstrak

Suatu bahan dikatakan berpotensi aktif sebagai antimalaria jika $IC_{50} < 5-50$ µg/ml, aktif lemah > 50 µg/ml sampai 100 µg/ml dan tidak aktif jika $IC_{50} > 100$ µg/ml (Pan dkk, 2018).

Adapun penelitian lain yang menggunakan spons *Xestospongia* sp. menunjukkan ekstrak spons *Xestospongia* sp. dari tahap partisi cair-cair beberapa pelarut antara lain pelarut etil asetat menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 21,75 µg/ml; pelarut air menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 46,63 µg/ml; pelarut heksan menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 16,73 µg/ml. Ekstrak *Xestospongia* sp. memiliki aktivitas antimalaria dengan melihat nilai IC_{50} yang terkecil berasal dari pelarut heksan yang bersifat non-polar dibandingkan dengan pelarut air yang bersifat polar dan pelarut etil asetat (Murtihapsari, 2010).

Penelitian lanjutan Murtihapsari dkk, 2017 pada isolat murni dengan galur 3D7 menunjukkan IC_{50} sebesar 6.49×10^{-7} µg/ml. Suatu bahan dikatakan berpotensi sebagai antimalaria jika nilai $IC_{50} < 50$ µg/ml untuk ekstrak sedangkan untuk fraksi nilai $IC_{50} < 25$ µg/ml

(Murtihapsari dkk, 2017).

Pada penelitian ini diperoleh bahwa ekstrak spons *Xestospongia* sp. menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 46.51 µg/ml. Oleh karena itu ekstrak spons *Xestospongia* sp. berpotensi aktif sebagai antimalaria.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian analisis data dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak spons *Xestospongia* sp. memiliki efek penghambatan setelah inkubasi 72 jam pada masing-masing konsentrasi 0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml; dan 1000 µg/ml yaitu 15.67%; 24.83%; 45.50%; 54.17%; dan 68.00%.
2. IC₅₀ ekstrak spons *Xestospongia* sp. dengan analisis probit sebesar sebesar 46.51 µg/ml yang berpotensi aktif sebagai antimalaria.

KEPUSTAKAAN

- Depkes, RI. (2006). *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan lingkungan.
- Donia, M., Hamann, M.T. (2003). Marine Natural Products and Their Potential Applications as a Anti Infective agents. *The Lancet Infectious Diseases Vol 3*. pp: 338-346
- Fattorusso, E., Scafati, O.T. (2009). Marine Antimalarials. *Marine Drugs No 7*. hal 130-152
- Harijanto. (2009). *Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*. Jakarta: EGC. hal 119-120.
- Joseph, B., Sujatha, S. (2011). Pharmacologically Important Natural Products from Marine Sponges. *Journal of Natural Products Review Vol. 4*: 05-12
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., Jain, R. (2009). Antimalaria From Nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- Laurent, D., Jullian, V., Parenty, A., Knibiehler, M., Dorin, D., Schmitt, S., et al. (2006). Antimalarial Potential of Xestoquinone, a Protein Kinase Inhibitor Isolated From a Vanuatu Marine Sponge *Xestospongia* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry 14*. pp: 4477-4482.
- Lusina, H. (2009). Isolasi dan Uji Anti Plasmodium Secara In Vitro Senyawa Alkaloid dari *Albertisia papuana* Becc. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Mudi, S.Y., Muhammad, A. (2009). Antimalaria Activity of Ethanolic Extracts of Leaves *Terminalia Catappa* L. *Combrecetaceae* (Indiari Almond). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences 2(1)*. pp: 14-18
- Murtihapsari. (2010). Penapisan Bahan Aktif Spons *Xestospongia* sp. dan *Haliclona* sp. Asal Papua Serta Aktivasnya Dalam Menghambat Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* Galur W2 dan D6 Secara In Vitro. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Murtihapsari, Herlina T., Apriyanti, E. (2017). Isolasi Spons *Xestospongia* sp. Asal Kaimana Papua Barat dan Uji Antimalaria Terhadap *P. falciparum*. *Jurnal ITEKIMA vol 1, no 1*
- Nofiani, R., Ardiningsih, P., Mustofa, Matsje, S. (2009). Aktivitas Antimikroba dan Antiplasmodium Berbagai Ekstrak Metabolit Sekunder Mikroba yang Berasosiasi dengan Invertebrata Laut. *Jurnal Penelitian Universitas Tanjungpura Volume XVI No.*

4.
Pan, W.H., Xu, X.Y., Shi, N., Tsang, S.W., dan Zhanf, H.J. (2018). Antimalarial Activity of Plant Metabolites. *Int.J.Mol.Sci.* 19(5): 1382.
- Ravichaddran, S., Kathiresan, K., Balam, H. (2009). *Anti-malarials From Marine Sponges. Biotechnology and Molecular Biology Review Vol. 2 (2).* pp: 033-038.