

**AKTIVITAS INHIBISI PERTUMBUHAN *MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DAN
PLASMODIUM FALCIPARUM DARI EKSTRAK METANOL DAUN BOTTO-BOTTO
(*Chromolaena odorata* Linn)**

**Nursalam Hamzah, Nurfadilah Absa, St Rahmah Akbar, Syamsuri Syakri, Nur Syamsi
Dhuha, Isriany Ismail**

Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin
Jalan H.M. Yasin Limpo No.36 Sungguminasa, Kabupaten Gowa
Email :nursalam.hamzah@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tuberkulosis dan malaria merupakan dua penyakit infeksi berbahaya yang menyebabkan kematian jutaan orang, hampir setiap tahun. Pengobatannya mengalami kendala sebab terjadinya resistensi antituberkulosis dan antimalaria saat ini. Untuk itu dibutuhkan obat baru untuk mengatasi resistensi oleh penyakit-penyakit infeksi tersebut. Salah satu sumber obat baru Indonesia adalah tumbuhan botto-botto. Tumbuhan ini telah dimanfaatkan dalam etnofarmakologi sebagai obat antibakteri. Untuk itu perlu diteliti kemampuan tumbuhan botto-botto sebagai obat antituberkulosis dan malaria. Prosedur dimulai dengan ekstraksi daun botto-botto yang telah kering dengan pelarut metanol. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas antiplasmodium dengan metode Desjardins dan antituberkulosis dengan metode MODS. Hasilnya bahwa ekstrak metanol daun botto-botto menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dan mungkin menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*.

Kata Kunci : Ekstrak, Botto-botto, antiplasmodium, antituberkulosis

PENDAHULUAN

Tuberkulosis dan malaria merupakan beberapa penyakit menular yang mematikan di dunia. Jutaan penderita tuberkulosis dan malaria masih menjadi masalah utama kesehatan di dunia, jutaan orang meninggal tiap tahunnya karena kedua penyakit ini.

Insiden dan kematian akibat malaria masih begitu tinggi. Pada tahun 2016, diperkirakan 216 juta kasus malaria terjadi di seluruh dunia. Nilai ini sebenarnya menurun jika dibandingkan dengan tahun 2010 dimana terjadi 237 juta kasus, tetapi mengalami kenaikan dalam setahun terakhir dimana pada tahun 2015 terjadi 211 juta kasus. Sebagian besar kasus malaria pada tahun

2016 berada di Wilayah Afrika (90%), diikuti oleh Wilayah Asia Selatan dan Tenggara (7%) dan Wilayah Mediterania Timur (2%). Sebanyak 91 negara (yang asli terdapat penyebaran nyamuk pembawa *plasmodium* patogen) yang melaporkan kasus malaria di tahun 2016, dimana 15 negara berada di daerah sub-Sahara Afrika dan India, menjadi daerah-daerah kasus tinggi malaria, sebesar 80% dari keseluruhan kasus. Secara global, angka kejadian malaria diperkirakan telah menurun sebesar 18%, dimana angka API dari 76 menjadi 63 kasus per 1000 penduduk berisiko, antara tahun 2010 dan 2016. Secara global pada tahun 2016, diperkirakan ada terjadi 445.000 kematian akibat malaria, menurun jika dibandingkan

dengan tahun 2015 sebanyak 446.000. Sebanyak 91% dari seluruh kematian akibat malaria pada tahun 2016 terjadi di wilayah Afrika, diikuti oleh Wilayah Asia Selatan dan Tenggara (6%). 80 % kematian akibat malaria global pada tahun 2016 juga terjadi di wilayah Afrika dan India. Semua wilayah mengalami penurunan angka kematian pada tahun 2016 jika dibandingkan dengan tahun 2010, kecuali Wilayah Mediterania Timur, di mana tingkat kematian tetap tidak berubah pada periode tersebut. Penurunan terbesar terjadi di wilayah Asia Selatan dan Tenggara (44%), Afrika (37%) dan Amerika (27%) (pembagian wilayah berdasarkan *WHO region*) (World Health Organization 2017b).

Sementara itu di Indonesia, penyakit malaria masih menjadi salah satu masalah penting dalam kesehatan. Berdasarkan laporan PUSDATIN (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI), dinyatakan bahwa pada tahun 2015 insiden positif malaria dalam API adalah sebesar 0,85. Nilai ini mengalami penurunan dimana pada tahun 2011, API sebesar 1,75. Walaupun nilai API relatif menurun, tetapi pada beberapa wilayah sangat tinggi. Wilayah Papua dan Papua Barat menjadi wilayah dengan tingkat insiden malaria tertinggi, dengan angka API yaitu Papua 31,93, dan Papua Barat 31,29 (Kementerian Kesehatan 2016).

Jumlah kematian akibat tuberkulosis di dunia juga besar. Tuberkulosis adalah

penyebab kematian kesembilan di seluruh dunia dan penyebab utama dari penyakit infeksi, setelah HIV/AIDS. Pada tahun 2016, diperkirakan terdapat sekitar 1,3 juta kematian (12,5% dari seluruh penderita tuberkulosis) pada pasien tuberkulosis dengan HIV-negatif (turun dari 1,7 juta pada tahun 2000) dan tambahan 374.000 kematian pasien tuberkulosis komplikasi dengan HIV. Diperkirakan 10,4 juta orang menderita tuberkulosis pada tahun 2016 (rata-rata 140 pasien dari 100.000 penduduk dunia), dimana 90% adalah orang dewasa, 65% adalah laki-laki, 10% merupakan pasien komplikasi dengan HIV (74% di Afrika) dan 56% berada di lima negara: India, Indonesia, China, Filipina dan Pakistan. Sebanyak 601.000 pasien mengalami resistensi obat (rata-rata 8,1 pasien dari 100.000 penduduk atau 5,8% dari total seluruh pasien tuberkulosis) (World Health Organization 2017).

Insiden tuberkulosis di Indonesia juga cukup besar, walaupun semakin ke kini semakin kecil nilainya. Indonesia berada diposisi kedua setelah India, dengan persentase 10% dari seluruh total penderita tuberkulosis di dunia. WHO mengestimasi pada tahun 2016 terdapat 1.020.000 kasus tuberkulosis (rata-rata 391 penderita dari 100.000 penduduk atau 0,4% dari seluruh penduduk Indonesia). Sebanyak 45.000 orang termasuk dalam penderita tuberkulosis komplikasi dengan HIV (rata-rata 17 pasien dari 100.000 penduduk atau 4,4% dari total seluruh pasien

tuberkulosis). Diperkirakan sebanyak 32.000 termasuk pasien yang mengalami resistensi obat (rata-rata 12 pasien dari 100.000 penduduk atau 3,1% dari total seluruh pasien tuberkulosis). Jumlah kematian akibat tuberkulosis pada tahun 2016 adalah 110.000 pasien (rata-rata 42 pasien dari 100.000 penduduk atau 10,8% dari total seluruh pasien tuberkulosis). Sedangkan jumlah kematian akibat tuberkulosis yang komplikasi dengan HIV pada tahun 2016 adalah 13.000 pasien (rata-rata 5.1 pasien dari 100.000 penduduk atau 11,8% dari total seluruh pasien tuberkulosis yang meninggal) (World Health Organization 2017). Jika dibandingkan dengan data Kementerian Kesehatan, disebutkan bahwa pada tahun 2013 prevalensi tuberkulosis yang telah terdiagnosis adalah 0,4% dari jumlah penduduk. Dengan kata lain, rata-rata tiap 100.000 penduduk Indonesia terdapat 400 orang yang didiagnosis oleh tenaga kesehatan menderita tuberkulosis. Dengan jumlah penduduk Indonesia sebesar 250 juta orang, maka jumlah kasus sebanyak satu juta. Jumlah ini tidak jauh berbeda dengan data WHO. Lima daerah dengan laju kasus tuberkulosis terbesar di Indonesia (per 100.000 penduduk), yaitu Sulawesi Utara sebanyak 243 orang, DKI Jakarta sebanyak 254 orang, Papua Barat sebanyak 267 orang, Maluku sebanyak 281 orang, dan Papua sebanyak 302 orang. Daerah dengan laju kasus paling rendah di Indonesia adalah DIY, sebanyak 74 kasus. Laju kasus

tuberkulosis di Indonesia jika dilihat dari tahun 1999 cenderung meningkat, walaupun telah mengalami stagnansi dalam empat tahun terakhir (2011-2014) (Kementerian Kesehatan 2015). Meskipun sebagian besar kematian akibat tuberkulosis dapat dicegah, tapi jumlah korban meninggal akibat penyakit ini masih tinggi, sehingga diperlukan upaya untuk mengatasi penyakit ini.

Sulitnya menangani penyakit malaria dan tuberkulosis disebabkan oleh resistensi obat oleh *Plasmodium* penyebab malaria dan *Mycobacterium* penyebab tuberkulosis. Pengobatan tuberkulosis saat ini juga kurang begitu nyaman sebab harus mengkonsumsi obat beberapa jenis obat tersebut dalam jangka waktu panjang.

Faktor penyebab insiden dan kematian akibat malaria adalah beberapa jenis parasit *Plasmodium*. Pada wilayah sub-Sahara Afrika, *Plasmodium falciparum* adalah parasit malaria yang paling umum ditemukan, terhitung 99% dari keseluruhan kasus malaria pada tahun 2016. Di luar Afrika, *Plasmodium vivax* adalah parasit yang dominan di Wilayah Amerika, mewakili 64% kasus malaria, dan Asia Selatan dan Tenggara di atas 30% dan wilayah Mediterania Timur 40% (World Health Organization 2017b). Penyebaran *plasmodium* terutama yang resisten terhadap obat antimalaria telah terdapat di Indonesia, seperti misalnya varian resisten klorokuin. Seorang pasien dari Amerika yang telah mengkonsumsi

klorokuin sebelum ke Papua ternyata tetap terkena malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium vivax* (Schwartz, Lackritz and Patchen 1991). *Plasmodium palciparum* yang terdapat di daerah Asia Tenggara juga telah dilaporkan menghasilkan varian yang resisten terhadap hampir seluruh antimalaria, mulai dari klorokuin, sulfadoksin, pirimetamin, kuinin dan meflokuin, termasuk laporan resistensi terhadap artemisinin, padahal obat ini merupakan pilihan pertama dan paling manjur di dunia dalam pengobatan malaria saat ini. *Plasmodium* resisten artemisinin ini mengakibatkan pembersihan parasit yang lambat pada pasien dan peningkatan kelangsungan hidup parasit, disebabkan oleh polimorfisme nukleotida tunggal pada gen K13 dikaitkan dengan jalur *unfolded protein response* yang berlawanan dengan aktivitas pro-oksidan artemisinin (Fairhurst and Dondorp 2016).

Resistensi juga terjadi pada penyakit tuberkulosis dan menjadi ancaman dalam pengobatannya. Resistensi yang terjadi umumnya adalah *Multi drug resistant tuberculosis* atau disingkat MDR-TB, didefinisikan sebagai resistensi terhadap dua antituberkulosis dari lini pertama yang paling ampuh yaitu isoniazid (INH) dan rifampisin. Resistensi juga dapat terjadi hanya pada rifampisin, disebut dengan *rifampicin-resistant tuberculosis* disingkat RR-TB. Pada tahun 2016, jumlah kasus MDR-TB adalah sebesar 490,000 kasus dan tambahan RR-TB sebesar 110.000 kasus. Negara dengan jumlah kasus

JF FIK UINAM Vol.5 No.4 2017

MDR/RR-TB terbesar (47% dari total global) adalah China, India dan Federasi Rusia (World Health Organization 2017). Salah satu pencegahan MDR-TB, tuberkulosis yang mengalami resistensi dengan lebih dari satu jenis obat, yang telah direkomendasikan secara internasional yaitu melalui strategi *directly observed treatment shortcourse* (DOTS) yang terbukti efisien dalam pengobatan serta efisien dalam biaya, meskipun dalam beberapa kasus pengobatan yang diberikan gagal disebabkan beberapa kondisi tertentu (Bhatia, Hyder and Nair 2011). Metode ini hanya untuk perbaikan dalam kepatuhan mengkonsumsi obat, bukan untuk membunuh mikobakterium penyebab penyakit. Penggunaan multi obat dalam jangka waktu yang panjang saat terbukti menyulitkan pasien dalam mengkonsumsi obat. Terapi dengan beberapa jenis obat dimana aturan pakainya berbeda-beda, cukup menyulitkan pasien dalam mengingat jenis obat yang telah diminumnya. Adanya pendamping cukup dapat mengatasi masalah tersebut, tetapi tentu saja obat dengan aktivitas yang luas sehingga dapat menggantikan obat-obat yang telah ada menjadi hanya satu jenis saja lebih nyaman digunakan.

Dorongan kebutuhan untuk mengatasi resistensi antimalaria dan antituberkulosis, serta kenyamanan dalam pengobatan tuberkulosis, mendesak para peneliti untuk terus meneliti antimalaria dan antituberkulosis baru. Salah satunya

280

melalui penemuan senyawa aktif yang berasal dari bahan alam khususnya tumbuh-tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat.

Botto-botto atau dalam Bahasa Latin *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob., Familia *Asteraceae* adalah semak yang berasal dari Amerika, namun sekarang banyak tumbuh di daerah sub-Sahara Afrika, Asia dan Oceania. Spesies ini dikenal dengan beberapa nama, seperti Laruna, dan Gondrong-gondrong. Beberapa daerah lain misalnya, memiliki nama tersendiri, Kopasanda di Maros, Ki Rinyuh di Sunda, Tekelan di Jawa, Siam Weed atau Jack in the Bush di Inggris (Prawiradiputra 2007). Tanaman ini telah menjadi gulma yang cukup mengganggu, walaupun tetap digunakan masyarakat sebagai obat. Spesies ini, khususnya yang ditemukan di Asia dan Afrika Barat, memiliki banyak penggunaan etnofarmakologis, termasuk pengobatan malaria, luka, diare, infeksi kulit, sakit gigi, disentri, sakit perut, sakit tenggorokan, kejang, hemoroid, batuk dan pilek. Kandungan kimia memiliki aktivitas antibakteri yang luas, mulai dari senyawa polar hingga non-polar, dapat dilihat dari aktivitas antibakteri ekstrak air hingga sikloheksan dari tanaman ini. Metabolit sekunder yang dikandung berupa senyawa golongan fenolik, flavonoid, alkaloid dan minyak esensial. Selain itu juga mengindikasikan mengandung senyawa golongan tannin, terpenoid,

glikosida jantung, saponin dan antrakuinon (Omokhua, et al. 2016).

Hal inilah yang mendorong banyak peneliti untuk melakukan pengujian aktivitas dari daun botto-botto, termasuk sebagai antiplasmodium dan antituberkulosis.

METODE PENELITIAN

A. Ekstraksi Sampel

1. Penyiapan sampel

Sampel penelitian diambil pada daerah Samata Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan, sebanyak 10 kg basah, kemudian dibersihkan dari kotoran dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering suhu sekitar 50° C. Setelah itu daun diserbukkan hingga ukuran sekitar 40 mesh.

2. Ekstraksi dengan metode maserasi

Serbuk daun Botto-botto ditimbang sebanyak 5 kilogram. Serbuk daun Botto-botto yang telah ditimbang dimasukkan dalam bejana maserasi dan selanjutnya dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak sampai seluruh serbuk terendam dan ketinggian pelarut 1 cm dari permukaan serbuk. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat dan ampas dipisahkan dalam wadah yang berbeda, ampas yang didapatkan dimaserasi kembali dengan menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali, proses ini dilakukan hingga cairan penyari tidak

dapat lagi menarik senyawa yang terdapat dalam sampel atau telah jenuh. Seluruh filtrat yang telah didapatkan dikumpulkan dan dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian diangin-anginkan hingga kering dalam desikator. Ekstrak yang telah kering digunakan untuk uji aktivitas inhibisi pertumbuhan *Micobacterium tuberculosis* strain H₃₇RV dan *Plasmodium falciparum* strain 3D7.

B. Uji Golongan Senyawa

1. Uji kandungan senyawa alkaloid

Kandungan alkaloid diuji dengan tiga pereaksi, yaitu dragendorff, mayer dan wagner. Pereaksi Dragendorff dibuat dimulai dengan bismut (III) nitrat sebanyak 0,8 g dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Larutan ini dicampurkan dengan larutan kalium iodida yang dibuat dengan melarutkan 27,2 g kalium iodida dalam 50 mL akuades. Campuran ini diaduk sebentar, kemudian didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling sampai volumenya 100 mL. Pereaksi berwarna jingga.

Pereaksi Mayer dibuat dengan cara 1,358 g merkuri (II) klorida dilarutkan dalam 60 ml air suling. Larutan ini dicampurkan dengan larutan kalium iodida yang dibuat dengan cara 5 g kalium iodida dilarutkan dalam 10 ml air suling. Campuran diaduk hingga merata, kemudian diencerkan dengan air suling sampai volume larutan menjadi 100 mL. Pereaksi ini tidak berwarna.

Pereaksi Wagner dibuat dibuat dengan cara melarutkan campuran 2,5 gram iodin dan 2 gram kalium iodida dalam 10 mL air suling hingga seluruh iodin melarut secara sempurna. Campuran ini diencerkan dengan air suling hingga volumenya menjadi 200 mL. Larutan yang terbentuk berwarna coklat.

5 mg ekstrak uji digerus dengan penambahan sedikit kloroform hingga larut. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL asam sulfat 1 M, kemudian dikocok perlahan. Didiamkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas yang jernih dibagi tiga, 1 bagian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendorff, bagian berikutnya ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Mayer, dan bagian terakhir ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Wagner. Endapan merah bata yang terbentuk oleh pereaksi Dragendorff dan endapan putih oleh pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa golongan alkaloid (R.Farnsworth 1966)

2. Uji kandungan senyawa flavonoid

Sebanyak 5 mg ekstrak uji dilarutkan dalam 5 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, lalu disaring. Filtrat yang didapat lalu ditambah serbuk magnesium secukupnya, 1 mL asam sulfat pekat dan 2 mL etanol. Dikocok kuat dan biarkan terpisah. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan etanol menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid (Tiwari 2011).

3. Identifikasi kandungan senyawa steroid/triterpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak uji dilarutkan dalam kloroform dan disaring. Kemudian filtrat ditambahkan beberapa tetes asam sulfat dan dikocok. Terbentuknya warna kuning emas mengindikasikan adanya senyawa golongan triterpen, sedangkan warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa golongan steroid (Tiwari 2011).

4. Uji kandungan senyawa fenolik

Sebanyak 0,5 gram ekstrak uji dilarutkan dengan 2 mL etanol 96% dan ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 0.1 M. Terbentuknya warna hitam kebiruan mengindikasikan adanya senyawa golongan fenol (Tiwari 2011).

C. Uji Aktivitas Antituberkulosis secara *in Vitro* (Ködmön 2016)

1. Pembuatan media cair *MiddleBrook 7H9*

Middlebrook 7H9 ditimbang sebanyak 0,65 g dan 0,138 g *casitone*, kemudian dimasukkan dalam wadah, ditambahkan 0,34 ml gliserol ke dalam wadah dan dicukupkan dengan air suling hingga volumenya 100 ml. Larutan dikocok sampai homogen, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama ± 20 menit pada suhu 121°C .

2. Pembuatan stok larutan ekstrak uji 2500 ppm

Ekstrak uji ditimbang seksama sebanyak 25 mg dan dimasukkan ke dalam wadah vial. Ekstrak dilarutkan menggunakan dimetil sulfoksida sebanyak 500 μl ke dalam masing-masing vial,

kemudian dihomogenkan dengan magnetik stirrer. Sampel disimpan sebagai larutan stok fraksi.

3. Suspensi bakteri *Mycobacterium Tuberculosis*

Diambil larutan media cair *middlebrook 7H9* sebanyak 25 ml, dan ditambahkan OADC 2,5 ml, PANTA + 4 OADC 0,5 ml, dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H_{37}RV sebanyak 1 ml, dan disuspensikan ke dalam tabung steril yang berisi 25 ml media *middlebrook 7H9* dan dihomogenkan.

4. Pengujian aktivitas metode MODS (*Microscopically Observed Drug Susceptibility*)

Plat sumuran 24 untuk strain H_{37}RV disiapkan dalam kondisi steril, Pengerjaan dilakukan secara aseptik dalam *Laminar air flow*. Sebanyak 50 μl DMSO ditambahkan ke plat H_{37}RV (masing-masing duplo) sebagai kontrol negatif. Sebanyak 50 μl obat isoniazid ditambahkan ke plate H_{37}RV (masing-masing duplo) sebagai kontrol positif. Selanjutnya dipipet 50 μl ekstrak/partisi/fraksi uji ke dalam well H_{37}RV (masing-masing duplo). Setelah itu, ditambahkan 950 μl suspensi bakteri ke dalam seluruh sumuran pada plat lalu dihomogenkan. Kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 7 hari pada suhu 37°C . Pengamatan koloni menggunakan mikroskop fluoresensi.

D. Uji Aktivitas Antiplasmodium Secara *In vitro*

Prosedur uji antiplasmodium dilakukan dengan menggunakan metode (Desjardins, Craig J. Canfield and Chulay 1979) yang disesuaikan dengan kondisi laboratorium, terdiri dari beberapa tahapan, yaitu :

1. Pembuatan medium tidak lengkap (*incomplete medium*)

Medium tidak lengkap dibuat dengan mencampurkan 10,4 gram RPMI-1640; 5,96 gram HEPES; 2,1 gram natrium bikarbonat; 0,05 gram hiposantin dan 0,5 mL gentamisin, lalu ditambahkan air bebas mineral sampai volume 1000 mL. Larutan disaring dengan kertas saring berukuran pori 0,22 µm, dimasukkan ke dalam botol *scott*, disimpan pada suhu 4°C. Medium ini diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan pH 7,3 – 7,4 sebelum digunakan. (Sara, M. et al 2011)

2. Persiapan medium lengkap

Medium lengkap adalah medium yang mengandung 10% serum manusia. Serum manusia ini berasal dari darah manusia yang diperoleh langsung dari PMI. Medium lengkap dibuat dengan mencampur medium tidak lengkap sebanyak 45 mL dengan serum darah manusia 5 mL.

3. Pembuatan suspensi parasit *P. falcifarum* strain 3D7

Kultur dalam cawan petri dipindahkan ke dalam tabung sentrifus. Dimasukkan 2 mL kultur dari tabung
JF FIK UINAM Vol.5 No.4 2017

sentrifus ke dalam tabung sentrifus yang baru, kemudian ditambahkan dengan 2,4 mL RBC (*Red Blood Cell*) dan 22 mL medium lengkap. Tabung sentrifus yang berisi suspensi parasit dimasukkan ke dalam *candle jar* dan disimpan dalam inkubator karbon dioksida pada suhu 37°C (Sara, M. et al 2011)

4. Pembuatan bahan uji

Prosedur pembuatan bahan uji dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- Sampel uji

Sebanyak 10 mg ekstrak uji dilarutkan dalam 100 µL dimetil sulfoksida (sebagai stok). Sebanyak 10 µL larutan stok ditambahkan dengan 490 µL medium lengkap sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 100 µg/mL. Pembuatan larutan uji dilakukan secara aseptik dan dibuat duplo.

- Kontrol positif

Kontrol positif dibuat menggunakan senyawa klorokuin pada media dengan bahan uji yang dilarutkan dalam dimetil sulfoksida hingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 0,5% sebanyak 500 µL dalam pelarut air bebas mineral dan dibuat duplo.

- Kontrol Negatif

Kontrol negatif dibuat dari parasit *p. falcifarum* strain 3D7 pada media tanpa bahan uji dan pelarut dimetil sulfoksida dan dibuat duplo.

5. Uji aktivitas senyawa sebagai antiplasmodium secara *in vitro*

Pengujian dilakukan dengan menggunakan suspensi parasit pada *plat well* 24 yang tiap-tiap fraksi senyawa uji ekstrak metanol daun Botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) direplikasi duplo. Tiap-tiap sumur akan diperlakukan sebagai berikut (Sara, M. et al 2011):

| Kode | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---|---|---|---|---|---|
| A |  |  |  |  |  |  |
| B |  |  |  |  |  |  |
| C |  |  |  |  |  |  |
| D |  |  |  |  |  |  |

Ket : AB6 = Kontrol negatif (blangko)
CD6 = Kontrol positif (klorokuin)

Medium lengkap dimasukkan kedalam masing-masing sumur sebanyak 1080 μ L. Fraksi senyawa uji dimasukkan 120 μ L pada masing-masing sumur kecuali sumur kontrol (negatif) sebanyak 1000 μ L, kemudian tambahkan 500 μ L suspensi parasit ke semua sumur, kecuali sumur kontrol (positif). Inkubasi *plat well* 24 ke dalam inkubator selama 48 jam (Sara, M. et al 2011).

6. Perhitungan persen penghambatan

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur dipanen dan dibuat hapusan darah tipis pada kaca preparat lalu difiksasi dengan metanol. Setelah kering diberi pewarna Giemsa 20%. Kemudian dibiarkan selama 15 menit, dialiri dengan air bebas mineral dan dikeringkan. Minyak *immerse* ditetaskan pada daerah yang monolayer (hapusan yang tipis) untuk memudahkan pengamatan pada mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Hitung % parasitemia dan % penghambatan pertumbuhan parasit dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1000 eritrosit di bawah mikroskop sebagai berikut: (Sara, M. et al 2011)

- % Parasetemia =
$$\frac{\Sigma \text{eritrosit yang terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$
 - % Pertumbuhan = % Parasitemia parasit (48 jam - 0 jam)
 - % Penghambatan =
$$100\% - \frac{X_u}{X_k} \times 100\%$$
- Dimana : X_u = parasitemia uji
 X_k = parasitemia kontrol (-)
- % Hambatan rata-rata =
 - $$\frac{\% \text{hambatan } ((1)+(2))}{2}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi dengan Metanol

Sampel sebanyak 10 kg daun botto-botto basah setelah dikeringkan akan menjadi 5 kg simplisia kering, yang selanjutnya dimaserasi dengan pelarut metanol sebanyak 17,5 Liter. Hasil ekstraksi adalah kstrak kental sebanyak 275,4 g.

$$\% \text{Rendamen} = \frac{274,42 \text{ gram}}{5000 \text{ gram}} \times 100\% = 5,49\%$$

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi

termasuk dalam ekstraksi padat-cair, dimana sampel berupa padatan dan bahan pengekstraksinya adalah cairan. Ekstraksi padat-cair merupakan salah satu teknik ekstraksi yang paling banyak digunakan di industri obat herbal. Proses ekstraksi padat-cair terdiri atas dua proses. Pertama adalah kontak padatan dengan cairan pelarut, sehingga dapat berpindah bahan yang dikandung ke pelarut. Pada dasarnya hal ini merupakan perpindahan massa yang bertujuan untuk mentransfer bahan-bahan yang dapat larut dari fasa padat ke dalam fase cair melalui difusi dan pelarutan. Zat terlarut yang akan pertama kali dilarutkan dari permukaan padatan, dan kemudian bahan

lain di dalam padatan berpindah ke dalam larutan dengan proses difusi. Proses ini dapat menyebabkan pembentukan pori-pori pada bahan padat sehingga pelarut dapat mudah berpenetrasi ke bagian dalam padatan. Proses kedua adalah pemisahan. Larutan yang terbentuk dari padatan yang melarut jenuh harus dipisahkan (Mandal, Mandal and Das 2015).

B. Golongan Senyawa

Ekstrak diidentifikasi golongan senyawanya dengan cara direaksikan dengan beberapa reagen yaitu $AlCl_3$, $FeCl_3$, mayer, dragendroff, liebermann-buchard (LB), dan wagner.

Tabel 1. Hasil Uji Golongan Senyawa

| Sampel | Golongan Senyawa | | | | | |
|-----------------|------------------|--------|---------|-----------|----------|----------|
| | Alkaloid | | Steroid | Flavanoid | Fenolik | |
| | Dragendorf | Wagner | Mayer | LB | $AlCl_3$ | $FeCl_3$ |
| Ekstrak metanol | + | + | + | + | + | + |

Keterangan :

- + : Mengandung
- : Tidak Mengandung

Hasilnya adalah bahwa ekstrak mengandung senyawa-senyawa golongan alkaloid, steroid, flavonoid dan fenolik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Akinmoladun & Ibukun (2007) yang menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun botto-botto mengandung senyawa golongan alkaloid, tannin, steroid, terpenoid, flavonoid dan glikosida jantung, sedangkan ekstrak airnya mengandung saponin, tannin, antrakuinon, steroid, terpenoid, flavonoid, dan glikosida jantung.

Senyawa golongan fenolik yang terdapat dalam tumbuhan botto-botto diantaranya *protocatechuic*, *p-coumaric*, *ferulic*, *p-hydroxybenzoic* dan *vanillic acids*. Senyawa golongan flavonoid diantaranya *rhamnetin*, *tamarixetin*, *omnibuin*, *kaempferid*, *isosakuranetin*, *odoratin*, *rhamnocitrin*, *laciniatin*, *acacetin*, *quercetin*, *kaempferol*, *sinensetin*, *sakuranetin*, *padmatin*, *marionol*, *luteolin*, *eupatilin*, *scutellarein-6,4'-dimethyl ether*, *luteolin-3',-4'-dimethyl ether*, *quercetin-3'',4'-dimethyl ether*, *naringenin-7',4''-dimethyl ether*, *eriodictyol-7,4'-dimethyl*

ether, aromadendrin-7,4'-dimethyl ether, 2,4-dihydroxy-4',5'',6'-trihydroxy chalcone, quercetin-7',3',4'-trimethyl ether, kaempferol-7,4-dimethyl ether, scutellarein-5,6,7,4'-tetramethyl ether, 2-hydroxy-3,4,4',5',6'-pentamethoxy chalcone, 2',4-dihydroxy-4',5',6'-trimethoxy chalcone, 4'-OH-5,6,7-trimethoxy flavone, scutellarein-tetramethyl ether, 2-OH-4',5',6',4,5-pentamethoxy chalcone, quercetagenin-3,5,7,'3-tetramethyl ether, 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone, 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxy flavone, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-rutinoside, taxifolin-4'-methyl ether, dan aromadendrin-4'-methyl ether. Senyawa golongan alkaloid merupakan turunan pyrrolizidine, yaitu 7-angeloylretronecine, 9-angeloylretronecine, 3'-acetylinderine, intermedine dan rinderine. Senyawa minyak esensial (umumnya turunan terpenoid) yang telah ditemukan dalam botto-botto yaitu α -pinene, β -pinene, germacrene D, β -copaen-4-alpha-ol, β -caryophyllene, geigerene, pregeigerene, cadinene, camphor, limonene dan isomer cadinol. Peneliti-peneliti lainnya menemukan trans-ocimene, bulnesol, δ -cadinene, geigerene, vestitenone, p-cymene, khusimone, α -muurolol, cyperene, epi-cubebol, cubebol, cis-sabinene hydrate, 10-epi- γ - eudesmol, germacrene-D-4-ol, himachalol, 7-isopropyl-1,4-dimethyl-2-azulenol, androencecalinol, 2-methoxy- 6- (1-methoxy-2-propenyl) naphthalene dan amyrrin (Finnie 2015).

C. Aktivitas Antituberkulosis

Metode yang digunakan dalam uji antituberkulosis adalah metode *Microscopically Observed Drug Susceptibility*, disingkat MODS, karena pada metode ini memiliki beberapa kelebihan yaitu penggunaan media cair (*middlebrook 7H9*) sehingga bakteri lebih cepat tumbuh, terdapat kandungan nutrisi pada media cair yaitu OADC (oxalid acid, albumin, destrosa, dan katalase) sebagai nutrisi pertumbuhan bakteri dan PANTA (polymyxin, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim and azlocillin) sebagai antibiotik agar tidak terjadi pertumbuhan bakteri lain, waktu pengerjaan berlangsung cepat, sekitar 7-14 hari.. Dan dilakukan pengamatan langsung di bawah mikroskop.

Metode ini merupakan metode biakan untuk kuman *Mycobacterium tuberculosis* dengan media *Middlebrook 7H9* yang sekaligus dapat mendeteksi kepekaan obat tuberkulosis secara mikroskopik. Uji kepekaan tersebut difasilitasi dengan *Middlebrook 7H9* ditambah obat antituberkulosis. Metode MODS mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode biakan yang lain dan dapat mendeteksi lebih cepat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dengan biaya yang relatif lebih murah serta cara yang mudah.

Metode MODS dapat digunakan untuk mendiagnosis yang sensitif (DST), monoresisten dan *multidrug resisten* (MDR) dengan cepat dibandingkan

dengan pengujian konvensional. Metode MODS telah dilaporkan memiliki kepekaan 97,8%, dan spesifitas 99,6% (Hardy Diagnostics 2012).

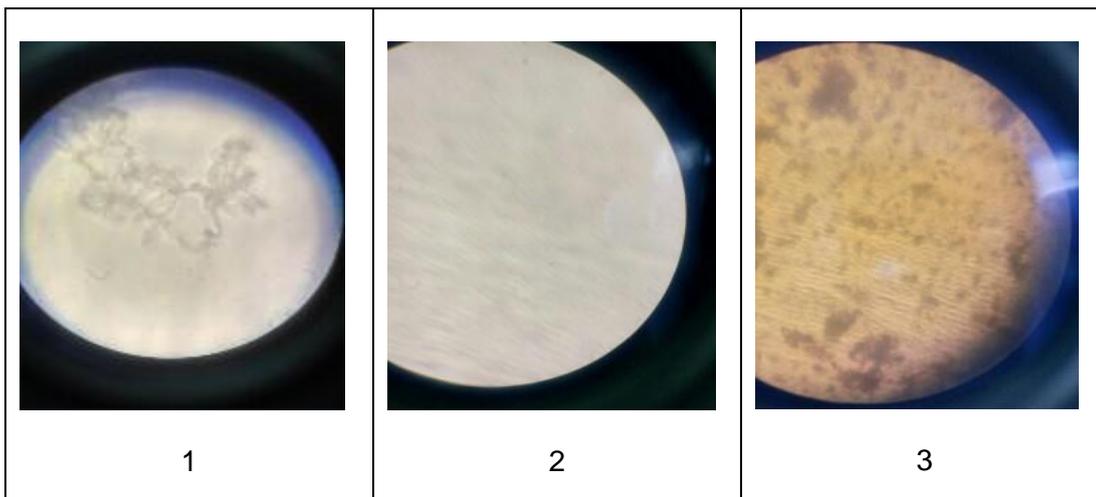
Mycobacterium tuberculosis yang digunakan adalah strain H₃₇RV adalah strain tuberkulosis yang paling banyak digunakan dalam penelitian. Bakteri ini pertama kali diisolasi oleh Dr. Edward R baldwin pada tahun 1905. Strain ini berasal dari seorang pasien berusia 19 tahun dengan penyakit tuberkulosis paru klinis di New-York. Seiring waktu, strain ini memiliki virulensi yang bervariasi. H₃₇R merupakan strain yang kurang ganas, H₃₇S merupakan strain yang ganas, dan H₃₇RV merupakan strain yang lebih ganas (*Virulent*).

Sampel dengan konsentrasi 2500 ppm diujikan dengan metode MODS pada plat sumuran 24 dengan *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇RV. Pertumbuhan mikobakterium diamati pada hari ke-7 menggunakan mikroskop. Kontrol negatif menggunakan DMSO, dan kontrol positif menggunakan obat isoniazid.

Tabel 2. Hasil uji Antituberkulosis

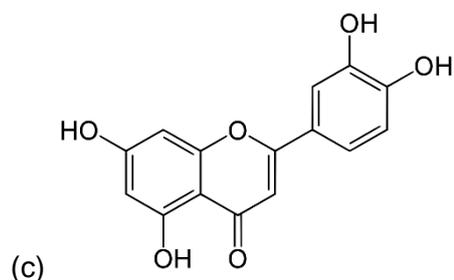
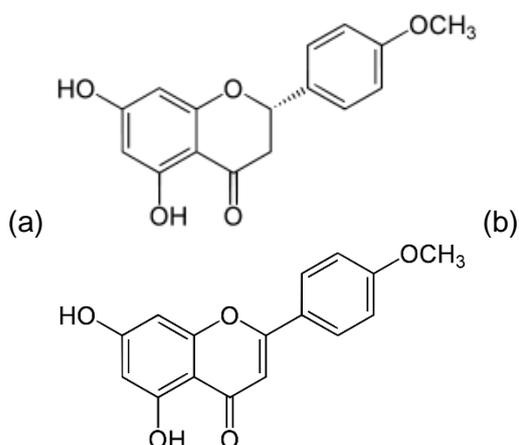
| No | Sampel Uji | Uji antituberkulosis | Keterangan |
|----|-------------|----------------------|---------------------|
| 1 | Kontrol (-) | Tidak Menghambat | Dapat diamati |
| 2 | Kontrol (+) | Menghambat | Dapat diamati |
| 3 | Ekstrak | - | Tidak dapat diamati |

Adapun hasil dari pengujian antituberkulosis, dengan *mycobacterium tuberculosis* diperoleh hasil untuk kontrol (-) dengan perlakuan penambahan DMSO terdapat pertumbuhan mikobakterium, untuk kontrol (+) dengan perlakuan penambahan obat isoniazid tidak terdapat pertumbuhan mikobakterium, ditandai dengan adanya bakteri *mycobacterium tuberculosis* yang membentuk *cord* pada sumuran dengan jumlah yang sedikit dibandingkan kontrol negatif. Untuk sampel ekstrak tidak dapat diamati, hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak yang tinggi sehingga sampel menutupi permukaan sumuran, atau konsentrasi zat aktif antituberkulosis dalam ekstrak daun yang kecil.



Gambar 1. Hasil Pengujian Antituberkulosis strain H37RV hari ke-7, (1) DMSO sebagai Kontrol (-), (2) Obat Isoniazid sebagai kontrol (+), (3) Ekstrak metanol daun botto-botto

Suksamrarn dkk. (2004) telah meneliti aktivitas antimikobakterium dan sitotoksik dari flavonoid yang terdapat dalam bunga botto-botto. Flavonoid *isosakuranetin* dilaporkan memiliki aktivitas antimikobakterium moderat, dengan nilai MIC 174,8 μM . Senyawa flavonoid lainnya seperti *acacetin* dan *luteolin* dilaporkan memiliki aktivitas yang rendah terhadap inhibisi pertumbuhan mikobakterium.



Gambar 2. Struktur (a) *isosakuranetin*, (b) *acacetin* dan (c) *luteolin*

D. Aktivitas Antiplasmodium

Metode yang digunakan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Desjardins dkk. (1979) dengan mengukur inkorporasi dari hipoksantin oleh parasit. Metode ini disebut juga metode *up take* 3H-hipoksantin. Pertumbuhan parasit diamati dari pemakaian isotop hipoksantin oleh metabolisme parasit yang tumbuh di dalam kultur. Dengan mengetahui jumlah penggunaan isotop oleh parasit, akan diketahui besarnya pertumbuhan parasit di dalam kultur. Setelah kultur diinkubasi 60 jam dan pertumbuhan kultur sehat serta tidak terkontaminasi, ditambahkan 50 ml campuran RPMI dan serum yang

mengandung isotop sebesar 0,25 mCi. Kultur dalam sumuran dicampur agar homogen, kemudian dimasukkan ke dalam *candle jar* untuk dikultur lagi selama 12 jam pada 37°C sehingga didapatkan masa inkubasi 72 jam. Selanjutnya, parasit dipanen menggunakan pemanenan sel semi-otomatik. Inkorporasi dari radiolabel ditentukan dengan *Liquid Scintillation Analyzer*. Data dari metode *schizont maturation test* dan *up take* 3H-hipoksantin dianalisis dengan mengukur persentase penghambatan pertumbuhan parasit. Konsentrasi penghambatan 50% (IC₅₀) senyawa uji ditetapkan dengan analisis probit, berdasarkan hubungan log kadar senyawa uji dengan % penghambatan pertumbuhan parasit (Syamsuddin 2008). Dalam percobaan ini dilakukan beberapa modifikasi seperti tidak lagi digunakan radio isotop,

pengaruh ekstrak langsung dihitung terhadap penghambatan pertumbuhan parasit.

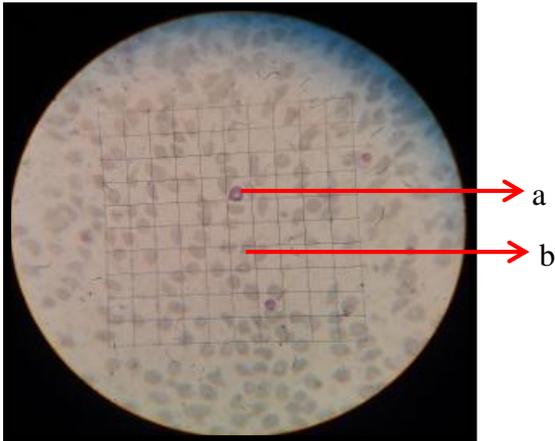
Parasit yang digunakan adalah *Plasmodium falciparum* strain 3D7 yang sensitif terhadap klorokuin stadium ring. Parasit ditumbuhkan secara *in vitro* dalam media pada suhu 38-40°C dan diberikan ekstrak pada konsentrasi 100 ppm. Setelah diinkubasi selama 48 jam, dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi. Hasilnya dikurangkan dengan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin. Uji anti plasmodium secara *in vitro* merupakan metode yang sangat berguna untuk pengembangan antimalaria, terutama untuk skrining antimalaria baru. Untuk pengembangan antimalaria baru, uji *in vitro* dapat menjadi dasar untuk uji *in vivo*, sebelum dilakukan uji klinik (Prasetyanto 2016).

Tabel 3. Hasil uji antiplasmodium ekstrak metanol daun Botto-botto

| Sampel Uji | R | % Parasitemia | | % Hambatan | % Hambatan rata-rata |
|-----------------|---|---------------|--------------|------------|----------------------|
| | | 0 Jam | 48 Jam | | |
| Kontrol (-) | 1 | 1,07 | 4,36 ± 0,005 | - | - |
| | 2 | 1,07 | 4,35 ± 0,005 | - | |
| Kontrol (+) | 1 | 1,07 | 0,49 ± 0,02 | 100 | 100 |
| | 2 | 1,07 | 0,45 ± 0,02 | 100 | |
| Ekstrak metanol | 1 | 1,07 | 0,50 ± 0,015 | 100 | 100 |
| | 2 | 1,07 | 0,47 ± 0,015 | 100 | |

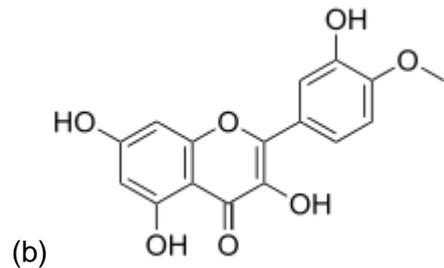
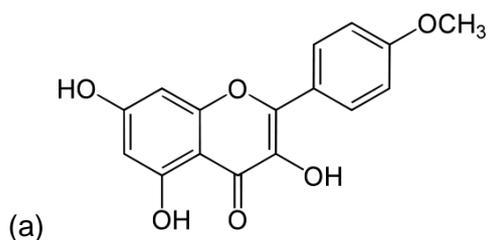
Persen penghambatan ekstrak metanol adalah 100%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun Botto-botto memiliki aktivitas sebagai antiplasmodium. Suatu ekstrak atau senyawa dikatakan mempunyai sifat antiplasmodium apabila dapat

memberikan penghambatan parasit lebih dari 30% (Nguyen-Pouplin, et al. 2007).



Gambar 3. Hasil Pengamatan Eritrosit di Bawah Mikroskop, a = eritrosit yang terinfeksi, b = eritrosit yang tidak terinfeksi

Jitendra dkk. (2011) telah mereview aktivitas dari botto-botto sebagai antimalaria, hemostatik, antioksidan, antipiretik, spasmodik, penghambatan kontraksi kisi kolagen terhidrasi (*Inhibits Hydrated Collagen Lattice Contraction*), antihelminik, penyembuhan luka, toksikosis, analgesic, antioksidan, diuretic, pencegahan pendarahan, antimikroba, antimikobakteria dan sitotoksik. Dilaporkan bahwa ekstrak kloroform daun botto-botto mengandung flavonoid *isosakuranetin*, *kaemferide*, dan *tamarixetin* yang aktif melawan *plasmodium palcifarum*, dengan nilai IC₅₀ masing-masing berturut-turut 30; 23,5 dan 25 µg/ml.



Gambar 4. Gambar struktur *kaempferide* (a) dan *tamarixetin* (b)

KESIMPULAN

Ekstrak metanol daun botto-botto memiliki aktivitas antiplasmodium dan mungkin memiliki aktivitas antituberkulosis

KEPUSTAKAAN

Akinmoladun, Afolabi Clement, and Emmanuel Ibukun. "Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*." *Scientific Research and Essay 2*, no. 6 (2007): 191-194.

Bhatia, Vineet, Md Khurshid Alam Hyder, and Nani Nair. "Drug resistance in tuberculosis in South-East Asia." *Regional Health Forum 15*, no. 1 (2011): 44-51.

Desjardins, Robert E., J. David Haynes Craig J. Canfield, and Jeffrey D. Chulay. "Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 16*, no. 6 (1979): 710-718.

Fairhurst, Rick M., and Arjen M. Dondorp. "Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria." *Microbiology Spectrum 4*, no. 3 (2016).

- Finnie, Aitebiremen G, Omokhua, Lyndy J. McGaw, Jeffrey F. "Chromolaenaodorata (L.) R.M.King&H.Rob.(Asteraceae) in sub-Saharan Africa : A synthesis and review of its medicinal potential." *Journal of Ethnopharmacology* (Research Centre for Plant Growth than Development, University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg.), 2015.
- Hardy Diagnostics. "Hardy TB MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay) Kit™." *TB MODS KIT* (The Hardy Diagnostics' manufacturing facility and quality management system), 2012.
- Jitendra, Patel, Qureshi Md Shamim, Kumar G.S., and Panigrahy Uttam Prasad. "Phytochemical and Pharmacological activities of Eupatorium odoratum L." *Research Journal of Pharmacy and Technology* 4, no. 2 (2011).
- Kementerian Kesehatan. *Infodatin Malaria*. Jakarta: Pusat data dan informasi Kementerian Kesehatan, 2016.
- Kementerian Kesehatan. *Pusat Data dan Informasi Tuberkulosis*. Jakarta Selatan: Kementrian Kesehatan Indonesia, 2015.
- Ködmön, Csaba. "Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union." *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC TECHNICAL DOCUMENT)*, Maret 2016.
- Mandal, Subhash C., Vivekananda Mandal, and Anup Kumar Das. *Essentials of Botanical Extraction; Principles and Applications*. Academic Press, 2015.
- Nguyen-Pouplin, Julie, et al. "Antimalarial and Cytotoxic Activities of Ethnopharmacologically Selected Medicinal Plants from South Vietnam." *Journal of ethnopharmacology* 109, no. 3 (2007): 417-427.
- Omokhua, Aitebiremen G., Lyndy J. McGaw, Jeffrey F. Finnie, and Johannes van Staden. "Chromolaena odorata (L.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae) in sub-Saharan Africa: A synthesis and review of its medicinal potential." *Journal of Ethnopharmacology* 183 (2016): 112-122.
- Prasetyanto, Budi. "Identifikasi Senyawa dan Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak dan Fraksi Kulit Kayu Pohon Mahoni (Swietenia macrophylla KING)." Skripsi, Pendidikan Kimia, UIN Sunan Kalijaga , Yogyakarta, 2016.
- Prawiradiputra, Bambang R. *Ki Rinyuh (Chromolaena odorata (L.) R. M. King & H. Robinson): Gulma Padang Rumput yang Merugikan*. Bogor: Balai Penelitian Ternak, 2007.
- R.Farnsworth, Norman. "Biological and Phytochemical Screening of Plants." *Journal of Pharmaceutical Sciences* (55), March 1966.
- Sara, M. et al. *Pengujian AKtivitas Antimalaria dan Insektisida Fraksi Etil Asetat dan Senyawa 5, 7, 2', 5", 7", 4"-Hekshidroksiflavanon-[3,8']-Falvon dari Batang Garcinia celebica Linn*. Kimia FMIPA-ITS, 2011.
- Schwartz, Ira K., Eve M. Lackritz, and Leslie C. Patchen. "Chloroquine-resistant Plasmodium vivax from Indonesia." *The New England Journal of Medicine* 324, no. 13 (1991): 927.
- Suksamrarn, Apichart, Apinya Chotipong, Tananit Suavansri, Somnuk Boongird, and Puntip Tirnsuksai. "Antimycobacterial Activity and Cytotoxicity of Flavonoids from the Flowers of Chromolaena odorata."

Archives of Pharmacal Research
27, no. 5 (2004): 507-511.

Syamsuddin. "Penapisan Senyawa Antimalaria yang Berasal dari Tumbuhan." *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 6 (2008): 95-99.

Tiwari, Prashant, Bimlesh Kuma. "Phytochemical Screenig and Extraction : A Review. International Pharmaceutical Science." *Internationale Pharmaceutica*

Sciencia 1, no. 1 (Jan-March 2011): 98-106.

World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2017*. Switzerland: WHO, 2017.

World Health Organization. *World Malaria Report 2017*. Switzerland: WHO, 2017b.