

Potensi Antimalaria Fraksi-Fraksi Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* [Hemsley] A. Gray)

Nuri ¹⁾, Yudi Wicaksono ¹⁾, Verdian Rahardi²⁾, Wiwien Sugih Utami ²⁾, Yunita Armiyanti ²⁾

¹ Fakultas Farmasi Universitas Jember

² Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Keywords:

Antimalarial
Fraction
Kembang bulan

ABSTRACT

Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* [Hemsley] A. Gray) has been used in traditional medicine to treat malaria. Previous research results showed that the ethanol extract of kembang bulan leaves had antimalarial activity in vivo with an ED₅₀ of 113.39 mg/kgBW. Until now, the compounds with antimalarial activity in vivo are unknown. The initial stage that can be done to separate the compounds in the extract is fractionation. This study aims to separate the extract into fractions and test its antimalarial activity. Fractionation was carried out using a vacuum liquid chromatography method using a stationary phase of silica gel GF254 and a mobile phase of n-hexane, chloroform and methanol in a gradient. In vivo antimalarial activity was tested using the Peter test method. Fractionation produces 5 fractions, each yield is 1.9; 2.1; 17.6; 60.8, and 17.6% respectively for fractions 1-5. The results of the antimalarial activity test for fractions 1-5 with a dose of 2 mg/kgBW showed inhibition of the growth of *Plasmodium berghei* respectively at 52.3 ± 1.4; 83.5±1.4; 74.6±1.2; 69.5±0.9; 44.8 ± 0.3%. Fraction 2 with the greatest resistance was tested further and showed an ED₅₀ value of 0.52 mg/kgBW..



[Journal of Agropharmacy](#) is licensed under [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International](#)

Email Koresponden Penulis: nuri.farmasi@gmail.com

1. PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit paling mematikan yang disebabkan oleh *Plasmodium* sp dan ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina. Di antara lima jenis *Plasmodium*, yakni *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. Ovale* dan *P. knowlesi*, *P. falciparum* yang dianggap paling berbahaya dan mematikan bagi manusia (Guerin dkk., 2022). Pada tahun 2020 WHO memperkirakan terdapat 241 juta kasus malaria, meningkat 6% dari 227 juta kasus malaria pada tahun 2019 (Rosenthal, 2022).

Salah satu faktor utama penyebab masih terjangkitnya infeksi malaria adalah timbulnya strain *Plasmodium* yang resisten terhadap obat malaria yang tersedia. Resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin di Indonesia pertama kali ditemukan di Kalimantan Timur pada tahun 1973. Resistensi ini terus menyebar ke seluruh Indonesia. Pada tahun 1990 dilaporkan telah terjadi resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin di seluruh provinsi di Indonesia (Depkes RI, 2006). Resistensi *P. falciparum* ini pun juga terjadi pada obat-obat antimalaria lain seperti primakuin dan sulfadoksin-pirimetamin, bahkan pada artemisinin monoterapi yang baru-baru ini dijadikan sebagai obat pilihan pertama (Depkes RI, 2009). Timbulnya resistensi *Plasmodium* sp terhadap obat-obatan antimalaria ini mendorong dilakukannya eksplorasi senyawa baru antimalaria. Salah satu sumber senyawa baru tersebut adalah tanaman obat.

Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) merupakan spesies tumbuhan yang termasuk dalam famili Asteraceae. Tumbuhan ini secara empirik telah lama digunakan oleh masyarakat Guatemala, Taiwan, Meksiko dan Nigeria untuk pengobatan malaria (Calzada dan Ciccio, 1978). Syarif (2007) menyatakan bahwa fraksi eter ekstrak metanol daun kembang bulan mempunyai aktivitas antiplasmodium pada *P. falciparum* strain FCR-3 secara *in vitro* dengan cara menghambat polimerisasi heme. Goffin dkk. (2002) melaporkan bahwa ekstrak kembang bulan secara *in vitro* mampu melawan tiga strain *P. falciparum*.

Hasil uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* tersebut perlu ditindaklanjuti dengan uji aktivitas *in vivo*. Hal ini *didasarkan* kepada kenyataan bahwa tidak semua bahan yang memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* menunjukkan hal yang sama jika diuji secara *in vivo*. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *T. diversifolia* memiliki aktivitas antimalaria secara *in vivo* dengan ED₅₀ sebesar 113,39 mg/kgBB (Nuri dkk., 2012). Sampai saat ini senyawa yang aktif sebagai antimalaria secara *in vivo* belum diketahui. Tahap awal untuk mengisolasi senyawa aktif adalah dengan memfraksinasi ekstrak sehingga dapat terpisah menjadi kelompok senyawa yang berbeda kepolarannya. Penelitian ini bertujuan untuk memfraksinasi ekstrak etanol daun kembang bulan. Fraksi-fraksi yang dihasilkan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo*.

2. METODE

2.1 Bahan

Daun kembang bulan dikumpulkan dari tanaman di perumahan Pondok Gede Jember (-8.198090, 113.695141) dan identifikasi di Herbarium Jemberiense Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember. Proses ekstraksi dan fraksinasi menggunakan etanol destilasi, n-heksana p.a, kloroform p.a., dan metanol p.a. Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan galur Balb-C yang didapat dari Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya dengan berat badan 20-30 g. *P. berghei* yang digunakan adalah strain ANKA yang didapat dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

2.2 Alat

Peralatan utama yang digunakan adalah rotavapor (Heidolph), timbangan analitik (Ohaus 2140), kolom kromatografi vakum diameter 5 cm, pipet ukur dan pipet volume, mikroskop (Olympus CH20).

2.1 Ekstraksi, Fraksinasi, dan Isolasi

Daun kembang bulan disortasi, dicuci dengan air bersih kemudian tiriskan selama 1 hari, selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai diperoleh simplisia kering. Simplisia kering digiling sampai halus, ditimbang 450 g dan dimaserasi dengan 2500 mL etanol 96% selama 24 jam kemudian disaring. Proses maserasi diulangi tiga kali. Filtrat ditampung kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Selanjutnya ekstrak kental di fraksinasi dengan kromatografi cair vakum menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak n-heksana, kloroform dan metanol secara gradien. Silika gel dimasukkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit sambil dihisap dengan pompa sampai setinggi kurang lebih 5 cm (Coll and Bowden, 1986). Ekstrak daun kembang bulan 10 g dimasukkan ke dalam kolom di atas fase diam, kemudian dilakukan proses fraksinasi. Hasil fraksinasi dikumpulkan berdasarkan profil kromatogramnya.

2.2 Uji Aktivitas Antimalaria

Uji aktivitas antimalaria dilakukan dengan tes Peter (Phillipson dan Wright, 1991). Sebelum dilakukan uji semua mencit diinokulasi dengan 0,2 ml darah terinfeksi *P. berghei* secara intraperitoneal. Pada hari berikutnya dilakukan pemeriksaan apakah mencit sudah terinfeksi. Mencit yang telah terinfeksi *P. berghei* digunakan untuk uji aktivitas antimalaria.

Uji aktivitas antimalaria fraksi-fraksi menggunakan 18 ekor mencit yang dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Kelompok ke 1 sampai ke 5 diberi perlakuan fraksi 1-5 secara oral dengan dosis 2 mg/kgbb sehari sekali selama 4 hari berturut-turut. Sedangkan kelompok ke 6 merupakan kelompok kontrol.

Pada hari pertama sampai keempat dilakukan pengambilan darah untuk dibuat hapusan dan diwarnai dengan giemsa 20%, selanjutnya dihitung derajat parasitemia nya. Pemeriksaan derajat parasitemia dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali dan dilakukan per 4000 eritrosit (Fidock dkk., 2004). Fraksi yang menunjukkan aktivitas paling tinggi diuji lebih lanjut dengan dosis 0,5; 1; 2; dan 4 mg/kgBB.

2.3 Evaluasi Hasil

Evaluasi dilakukan dengan cara menghitung persen penghambatan terhadap pertumbuhan *P. berghei* tiap-tiap dosis. Persen pertumbuhan dihitung dengan rumus (1).

$$\text{Pertumbuhan} = \text{Parasitemia hari ke-4} - \text{Parasitemia hari ke-0} \dots\dots\dots (1)$$

Persen penghambatan dapat dihitung dengan cara membandingkan pertumbuhan parasit masing-masing kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif, sesuai dengan rumus (2).

$$\% \text{ Penghambatan} = [100 - (\text{Pertumbuhan parasit kel. uji} / \text{Pertumbuhan parasit kel. kontrol})] \times 100\% \dots (2)$$

Nilai ED₅₀ (dosis yang dapat menghambat pertumbuhan 50% parasit) ditentukan menggunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara persen penghambatan dengan log dosis.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Serbuk simplisia daun Kembang Bulan sebanyak 450 g dimaserasi dengan etanol 96% redistilasi menghasilkan ekstrak kental sebanyak 67,9 g atau persentase rendemen sebesar 15,1% (Tabel 1). Secara organoleptis ekstrak tersebut berwarna coklat tua, rasanya pahit, dan berbau aromatis. Selanjutnya ekstrak difraksinasi dan uji aktivitas antimalaria nya.

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun kembang bulan.

No	Berat Simp. (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
1	450	67,9	15,1

Fraksinasi dilakukan secara kromatografi cair vakum dengan fase diam silika gel 60 dan fase diam *n*-heksana, kloroform dan metanol secara gradien menghasilkan lima fraksi. Berat masing-masing fraksi disajikan pada Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Hasil fraksinasi dan isolasi ekstrak daun kembang bulan.

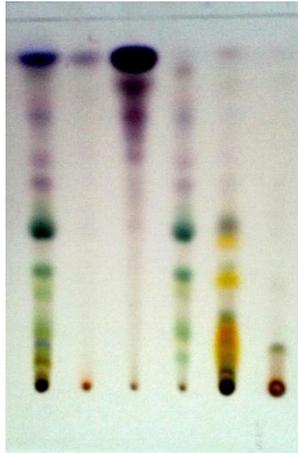
Fraksi	Berat Fraksi (mg)	Rendemen (%)
1	21	1.9
2	24	2.2
3	196.2	17.6
4	676.7	60.8
5	195.6	17.6

Fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak daun kembang bulan selanjutnya diuji aktivitas antimalaria nya. Hambatan fraksi-fraksi terhadap pertumbuhan *P. berghei* dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Hambatan pertumbuhan *P. berghei* oleh fraksi-fraksi 1-5 in vivo

Replikasi	Hambatan Pertumbuhan (%)				
	Fraksi-1	Fraksi-2	Fraksi-3	Fraksi-4	Fraksi-5
1	53,7	83,7	76	69	44,5
2	52,1	82	73,9	69	45
3	51	84,8	73,9	70,6	45
Rerata±SD	52,3±1,4	83,5±1,4	74,6±1,3	69,5±0,9	44,8±0,3

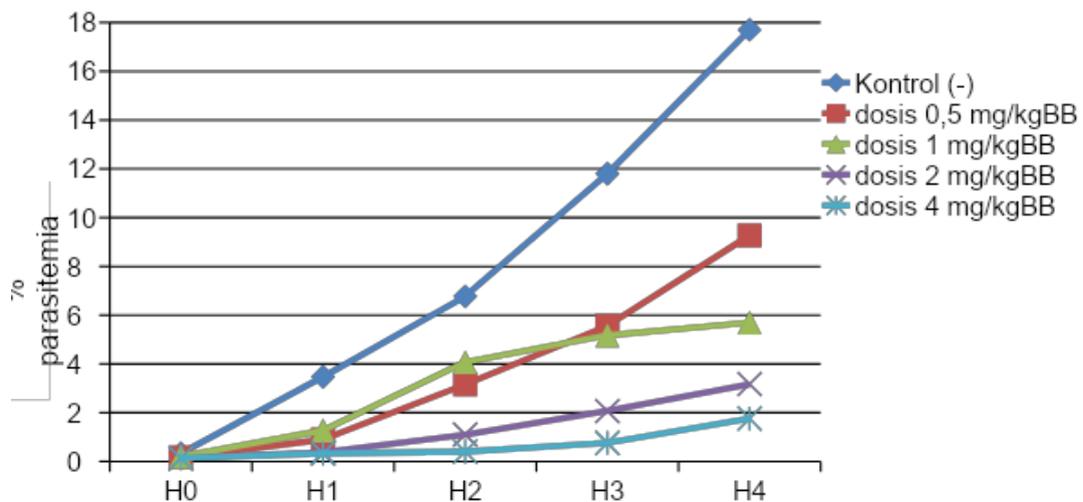
Tabel 3 menunjukkan bahwa pada dosis yang sama (2 mg/kgBB) fraksi-2 memiliki hambatan paling besar terhadap pertumbuhan *P. berghei*. Profil kromatogram fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak daun kembang bulan disajikan pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Profil kromatogram fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak kembang bulan dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd-asam sulfat

Berdasarkan Gambar 1 dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dominan pada fraksi 2 kemungkinan adalah senyawa golongan terpenoid. Senyawa golongan terpenoid dapat diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi penampak noda anisaldehyd-asam sulfat dan akan memunculkan noda berwarna ungu.

Fraksi-2 diuji lebih lanjut aktivitas antimalaria nya dengan beberapa peringkat dosis untuk menentukan nilai ED₅₀. Pengaruh berbagai dosis fraksi-2 terhadap pertumbuhan *P. berghei* ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan *P. berghei* pada hari ke-0 sampai hari ke-4 dengan perlakuan berbagai dosis fraksi 2.

Berdasar data pertumbuhan dapat dihitung persentase hambatan masing-masing dosis dan ditampilkan pada Tabel 4 berikut ini. Berdasarkan Tabel 4 dapat dihitung dosis yang dapat menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50% (ED₅₀) menggunakan analisis probit. Hasil analisis probit didapatkan nilai ED₅₀ dari fraksi aktif ekstrak etanol daun kembang bulan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* adalah sebesar 0,523 mg/kg BB. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Goffin dkk. (2002) yang menyatakan bahwa senyawa dalam daun Kembang Bulan yang memiliki aktivitas antiplasmodium adalah terpenoid, yakni seskuiterpen laktone tagitinin C.

Tabel 4. Persen Pertumbuhan dan Penghambatan Fraksi Aktif Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

Dosis Perlakuan (mg/kgBB)	% Pertumbuhan	% Penghambatan
0,5	9,10%	47,50% ± 2,88
1	5,50%	68,27% ± 8,478
2	3,03%	82,51% ± 1,523
4	1,63%	90,57% ± 1,447
Kontrol (-)	17,33%	0

4. KESIMPULAN

Fraksi-2 ekstrak etanol daun kembang bulan merupakan fraksi yang memiliki aktivitas antimalaria secara *in vivo* paling poten dengan ED₅₀ 0,52 mg/kgBB.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Calzada JG & Ciccio JF. 1978. Aislamiento de Tirofundina a partir de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. *Rev. Latinoamer. Quim* (9), pp 202 - 203.
- Chowdhury, K., Kantor, M., Sestras, R., (2009), Malaria Vaccine Candidate Diversity Offers Challenges and Opportunities for Effective Vaccine Development *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 37 (1) pp 9-16.
- Coll, JC. dan Bowden, BF. 1986. *The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpene Mixtures*. *Journal of Natural Products* 49 (5), 934-936
- David A. Fidock, DA., Philip J. Rosenthal, PJ., Simon L. Croft, SL., Brun, R., and Nwaka, S. 2004, Antimalarial Drug Discovery: Efficacy Models For Compound Screening. *Drug Discovery*. Vol. 3. pp. 509-520.
- Depkes RI. 2006. Pedoman *Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*. Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan lingkungan: Jakarta.
- Depkes RI. 2009. Penghentian *Monoterapi Artemisinin Mencegah Penyebarluasan Resistensi*. [<http://www.depkes.go.id/popups/newswindow.php?id=157&print=print>.] [28 Oktober 2012]
- Goffin E., Ziemons, E., De Mol, P., Do Ceu De Madureina, M., Martins. 2002. *In vitro* antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C. *Planta Med.* 68 (6): 543-545.
- Guerin, PJ., Olliaro, P., Nosten, F., Druilhe, P., Laxminarayan, R., Binka, F., Kilama, WL., Ford, N., and White, NJ. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 564-73
- Nuri, Wicaksono, Y, dan Utami, W.S., 2012. Pengembangan Daun Kembang Bulan menjadi Obat Herbal Terstandar Antimalaria sebagai Alternatif Penanggulangan Resistensi pada Parasit Malaria. Laporan penelitian.
- Phillipson JD. and Wright C.W., 1991. Antiprotozoal Agents Plant Sources. *Planta Medica*, 57 (1). pp. 553-559
- Syarif, RA., 2007. Aktivitas Antiplasmodium Fraksi Larut Eter Ekstrak metanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) pada *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. *Tesis*. Prodi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis. Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.