

Aktivitas Antimalaria Senyawa Tinokrisposid secara *in vivo*

1.

Adek Zambrut A*, Desy M. Gusmali**, M. Husni Mukhtar*

* Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang

**Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Departemen Kesehatan RI, Jakarta.

ABSTRAK

Telah dilakukan pemeriksaan aktivitas antimalaria senyawa tinokrisposid, suatu furanoditerpenglikosida baru dari batang *Tinospora crispa* (L) Miers ex Hook F. & Terms (brotowali) terhadap perkembangan *Plasmodium berghei* (ANKA) pada mencit putih jantan galur Swiss. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan dua cara: I) Cara dosis tunggal yaitu suspensi senyawa tinokrisposid diinjeksikan dulu ke dalam tubuh mencit, 30 menit kemudian baru diinjeksikan darah donor yang mengandung *Plasmodium berghei*. II) Cara dosis ganda yaitu mencit diinjeksi dulu dengan darah donor yang mengandung *P. berghei*, 24 jam kemudian baru diinjeksikan suspensi senyawa tinokrisposid. Pengamatan dilakukan terhadap persentase parasitemia mencit dengan membuat preparat sediaan darah tebal dan preparat sediaan darah lapis tipis dari darah mencit uji.

Selain itu diamati waktu kematian masing-masing mencit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa tinokrisposid dapat menekan perkembangan *P. berghei* dalam darah mencit uji secara sangat bermakna ($P < 0,05$). Efek optimal dicapai pada dosis 44 mg/kg bb.

PENDAHULUAN

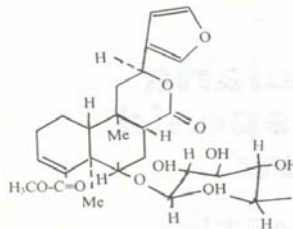
Tumbuhan merupakan salah satu sumber senyawa kimia baru yang penting, baik sebagai obat maupun sebagai senyawa model untuk mendapatkan senyawa aktif baru⁽¹⁾.

Tumbuhan brotowali (*Tinospora crispa*) telah lama digunakan untuk pengobatan. Kemudian diinformasikan bahwa ekstrak kasar tumbuhan ini berkhasiat sebagai antimalaria, antipiretika, antidiabetes, antiinflamasi dan analgetik^(1,2,3). *Tinospora crispa* mengandung zat pahit tinokrisposid dan beberapa alkaloid seperti aporfin, berberin dan palmatin^(1,4). Hasil pemeriksaan efek farmakologi senyawa tinokrisposid berkhasiat sebagai analgetik, koagulansia, antiinflamasi dan anti-diabetes⁽⁵⁾.

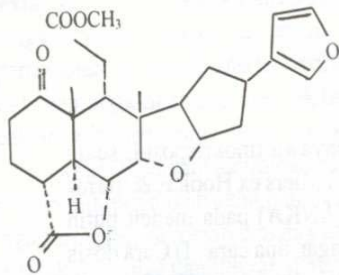
Senyawa tinokrisposid adalah suatu senyawa sangat pahit yang mempunyai struktur furanoditerpenglikosida. Struktur ini mirip dengan struktur senyawa nimbolid yang mempunyai efek antimalaria^(4,6).

Malaria merupakan salah satu penyakit yang disebabkan

oleh parasit. Penyakit ini telah lama dikenal dan paling luas penyebarannya terutama di daerah tropis. Sejak tahun 1956, WHO telah melaksanakan program pemberantasan penyakit malaria secara internasional dan hasilnya sangat memuaskan sampai tahun 70-an, tetapi belakangan ini penyakit malaria kembali meluas, disebabkan oleh munculnya galur plasmodium yang resisten terhadap obat-obat malaria yang ada^(7,8,9).



Gambar 1. Struktur tinokrisposid



Gambar 2. Struktur nombolid

Untuk mengatasi masalah di atas, dilakukan berbagai usaha pencarian obat baru, baik dari obat tradisional, obat sintetis, maupun pembuatan vaksin antimalaria⁽¹⁰⁾.

Berdasarkan informasi tentang struktur tinokrisposid dan khasiat brotowali secara tradisional sebagai antimalaria, maka dilakukan penelitian efek senyawa tinokrisposid terhadap malaria.

METODE PENELITIAN

Alat

Mikroskop binokuler, kaca objek, timbangan hewan, timbangan obat, tempat hewan, tabung reaksi berisi Na. EDTA, spuit & jarum suntik, lumpang & stanfer, pipa kapiler, kapas, kertas pH, label.

Bahan

Hewan percobaan mencit putih jantan galur swiss, *Plasmodium berghei* (ANKA), senyawa uji tinokrisposid, air suling, Na. CMC, Metanol 95%, tablet buffer (mengandung Dinatrium hidrogen fosfat 0,7 g dan Kalium dihidrogen fosfat 1,0 g), pewarna Giemsa, minyak imersi, eter anestetik.

Prosedur penelitian :

Senyawa uji tinokrisposid hasil isolasi dari brotowali oleh Adek Zambrut Adnan, dari laboratorium Kimia Bahan Alam Jurusan Farmasi UNAND, Padang. Kemudian dilakukan pemeriksaan kemurnian terhadap senyawa tersebut, yang meliputi pemerian, kelarutan, identifikasi dengan spektrofotometri yang meliputi pemeriksaan spektrum UV dan IR.

Mencit yang digunakan dalam uji antimalaria diinfeksi dengan menggunakan darah mencit donor yang mengandung *P. berghei*. Mencit donor didapatkan dengan menginjeksikan 0,2 ml darah yang mengandung parasit secara i.p yang sebelumnya diawetkan pada suhu -70°C atau dalam nitrogen cair terhadap 5 ekor mencit, kemudian dipelihara selama 5 hari. Dilakukan pemeriksaan persentase parasitemia darah mencit donor dengan membuat preparat darah tebal dan preparat darah lapis tipis. Sel darah merah yang terinfeksi di bawah mikroskop dilihat dan dihitung.

Darah terinfeksi dari mencit donor diambil dari mata

sebanyak 1-1,5 ml menggunakan pipa kapiler yang mengandung zat antikoagulan, kemudian darah ditampung dalam tabung reaksi yang berisi larutan Na. EDTA 0,05%. Darah donor yang didapat lalu diinjeksikan pada mencit normal sebanyak 0,1 ml secara i.p, lalu mencit dipelihara selama 5 hari untuk selanjutnya diambil darahnya yang akan digunakan sebagai sumber plasmodium uji antimalaria⁽¹¹⁾.

Mencit yang dinilai sehat digunakan dalam percobaan, berat badan mencit 20-15 g. Selama pemeliharaan perubahan bobot badan hewan tidak melebihi 10% dan secara visual menunjukkan perilaku normal⁽¹²⁾.

Mencit yang telah mengalami adaptasi dipilih sebanyak 42 ekor. 21 ekor dipakai untuk cara dosis tunggal dan 21 ekor lagi dipakai untuk cara dosis ganda. Untuk cara dosis tunggal dari 21 mencit dibagi 7 kelompok yang masing-masingnya 3 ekor mencit. 1 Kelompok digunakan sebagai kontrol yang diinjeksi dengan larutan pensuspensi Na. CMC 0,5% b/v sebanyak 0,1% berat badan dan 6 kelompok lagi diinjeksi dengan suspensi senyawa tinokrisposid masing-masingnya dengan dosis 15 mg/kg bb, 22 mg/kg bb, 30 mg/kg bb, 44 mg/kg bb, 62 mg/kg bb, 90 mg/kg bb; 30 menit kemudian diinjeksi dengan darah mencit donor yang mengandung *P. berghei*. Setelah 24 jam dibuat preparat sediaan darah tebal dan preparat darah lapis tipis. Sel darah merah yang terinjeksi dilihat dan dihitung di bawah mikroskop. Kemudian diamati hari kematian masing-masing mencit.

Untuk cara dosis ganda 21 ekor mencit dibagi atas 7 kelompok masing-masing 3 ekor mencit. Tiap-tiap kelompok diinjeksi dengan darah mencit donor yang mengandung *P. berghei*. Setelah 24 jam dibuat preparat sediaan darah tebal dan preparat sediaan darah lapis tipis; dihitung persentase parasitemianya. Satu kelompok digunakan sebagai kontrol dengan larutan pensuspensi Na. CMC 0,5% b/v sebanyak 0,1% berat badan dan 6 kelompok lagi diinjeksi dengan suspensi senyawa tinokrisposid masing-masing dengan dosis 15 mg/kg bb, 22 mg/kg bb, 30 mg/kg bb, 44 mg/kg bb, 62 mg/kg bb, 90 mg/kg bb, sekali perhari selama 3 hari berturut-turut. Sebelum pemberian suspensi tinokrisposid berikutnya diperiksa dan dihitung dulu persentase parasitemia darah mencit dengan membuat sediaan preparat darah tebal dan sediaan preparat darah lapis tipis sampai hari ke-4, yang dilihat dibawah mikroskop. Kemudian diamati hari kematian masing-masing mencit.

Pengolatan Data

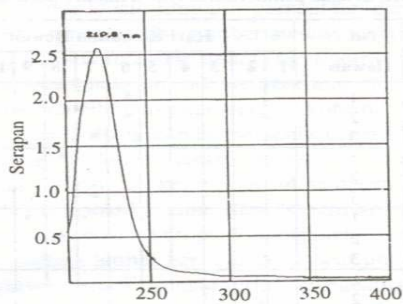
Data diolah secara statistik menggunakan Analisis Varian Satu Arah, alas data cara dosis tunggal dan data hari ke-4 pada cara dosis ganda. Uji Newman Keuls (SNK) dilakukan untuk melihat perbedaan antar kelompok serta melihat keefektifan senyawa tinokrisposid tersebut⁽¹³⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa tinokrisposid didapatkan berupa kristal jarum halus warna putih, rasa pahit, sukar larut dalam air, larut dalam etanol, metanol dan kloroform. Hasil identifikasi dengan spektrofotometer UV dan IR sesuai dengan literatur dapat dilihat pada **Tabel 1, Gambar 3-6**.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Senyawa Tinokrisposid

Data Pustaka ⁽⁴⁾	Pengamatan
Pemeriksaan Kristal jarum halus Warna putih Rasa sangat pahit	Kristal jarum halus Warna putih Rasa sangat pahit
Kelarutan Sukar larut dalam air, larut dalam etanol, metanol dan kloroform.	Memenuhi syarat
Identifikasi Spektrum UV λ maks. 211 nm Spektrum IR Serapan Oh = 3400 cm ⁻¹ CH = 3160 cm ⁻¹ C=O ester = 1710 cm ⁻¹	Spektrum UV λ maks. 219,8 Spektrum IR Serapan Oh = 3400 cm ⁻¹ CH = 3160 cm ⁻¹ C=O ester = 1710 cm ⁻¹



Gambar 3. Spektrum ultraviolet senyawa tinokrisposid dalam pelarut metanol

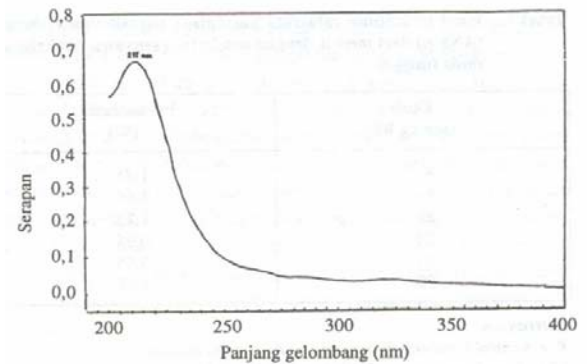
Pada penelitian pendahuluan untuk menentukan dosis yang akan digunakan diperoleh dosis terkecil yang memberikan efek adalah 15 mg/kg bb dan dosis terbesar adalah 90 mg/kg bb. Untuk menentukan kenaikan dosis digunakan rumus Malon Robinchaud⁽¹⁴⁾.

Senyawa tinokrisposid memberikan pengaruh menghambat pertumbuhan *P. berghei*. Secara umum hasil yang diperoleh baik pada cara dosis tunggal maupun pada cara dosis ganda adalah sama, yaitu efek optimal pada dosis 44 mg/kg bb. (Tabel 2.3 dan Gambar 7.8).

Ternyata persentase parasitemia semua kelompok perlakuan baik yang diberi suspensi senyawa tinokrisposid dan kelompok kontrol tetap ada dan cenderung terus meningkat.

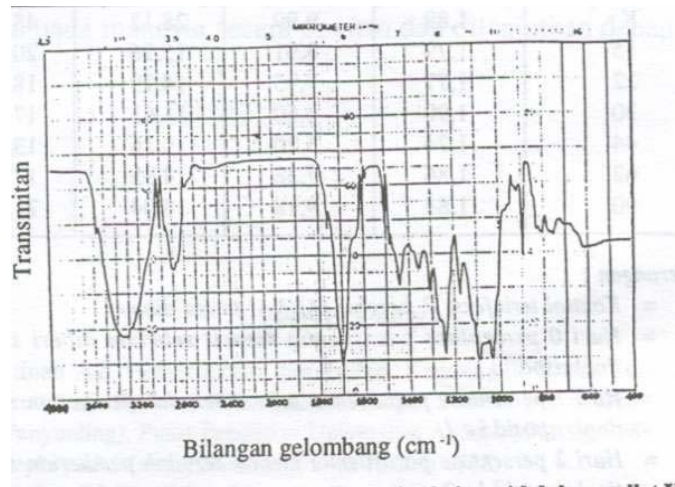
Kematian mencit percobaan terjadi mulai hari ke-6 dan seluruh mencit percobaan mati pada hari ke-15. (Tabel 4 dan Tabel 5).

Pada penelitian ini tidak digunakan obat umum yang biasa digunakan untuk mengobati malaria pada manusia, karena penelitian ini ditujukan sebagai uji pendahuluan untuk melihat indikasi senyawa tinokrisposid sebagai antimalaria. Selain itu belum diketahui pada fase apa senyawa ini bekerja terhadap *P. berghei*.

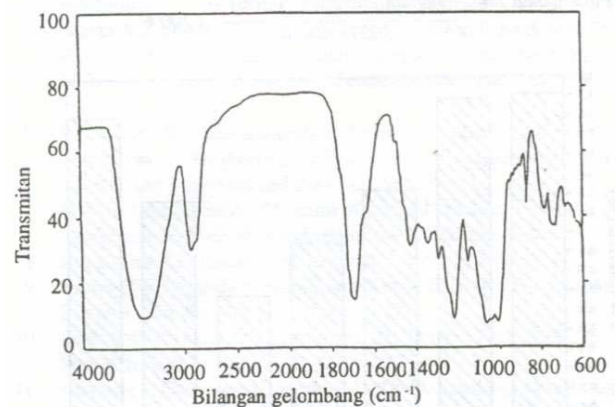


Gambar 4. Spektrum ultraviolet senyawa tinokrisposid dalam pelarut metanol dari literatur⁽⁴⁾.

Sampel : Tinokrisposid	Fase : KBr	Catatan :
Sumber : -	Konsentrasi : -	Nama : Drs. Mahyuddin
Spektrum NR : -	Pelarut : -	Tanggal : 25-4-1995
	Tebal lapisan : -	
	Referensi : -	



Gambar 5. Spektrum inframerah senyawa tinokrisposid dalam pellet KBr.



Gambar 6. Spektrum inframerah senyawa tinokrisposid dalam pellet KBr dari literatur⁽⁴⁾

Tabel 2.. Hasil penentuan rata-rata persentase parasitemia *P. berghei* (ANKA) dari mencit dengan pemberian senyawa tinokrisposid dosis tunggal.

Dosis (mg/kg BB)	Parasitemia (%)
K	1,71
15	1,69
22	1,22
30	0,95
44	0,68
90	1,61

Keterangan :

K = Kontrol terinfeksi *P. berghei* (ANKA) tanpa diobati
 Jumlah eritrosit terinfeksi

$$(\%) \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Tabel 3. Hasil penentuan rata-rata persentase parasitemia mencit dengan pemberian senyawa sinokrisposid dosis ganda

Dosis (mg/kg BB)	Parasitemia (%)			
	h ₀	h ₁	h ₂	h ₃
K	1,89	9,99	28,12	48,32
15	1,79	8,91	15,96	20,95
22	1,77	7,95	14,79	18,56
30	1,90	6,60	11,61	17,35
44	1,74	5,20	10,16	13,54
62	1,86	7,38	14,95	17,22
90	1,84	9,18	18,04	21,73

Keterangan :

K = Kontrol terinfeksi *P. berghei* (ANKA) tanpa diobati

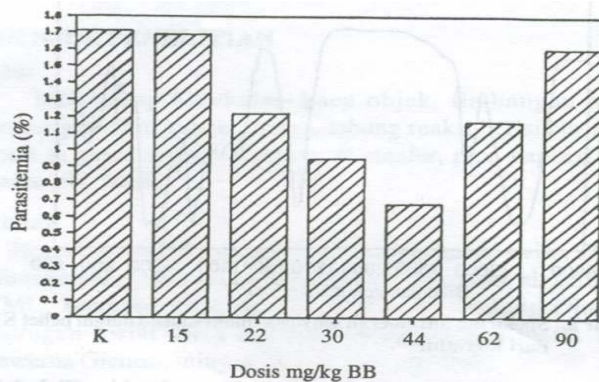
H₀ = Hari 0 persentase parasitemia mencit sebelum diberi senyawa tinokrisposid.

h₁ = Hari 1 persentase parasitemia mencit sesudah pemberian senyawa tinokrisposid ke 1.

h₂ = Hari 2 persentase parasitemia mencit sesudah pemberian senyawa tinokrisposid ke 2.

h₃ = Hari 3 persentase parasitemia mencit sesudah pemberian senyawa tinokrisposid ke 3.

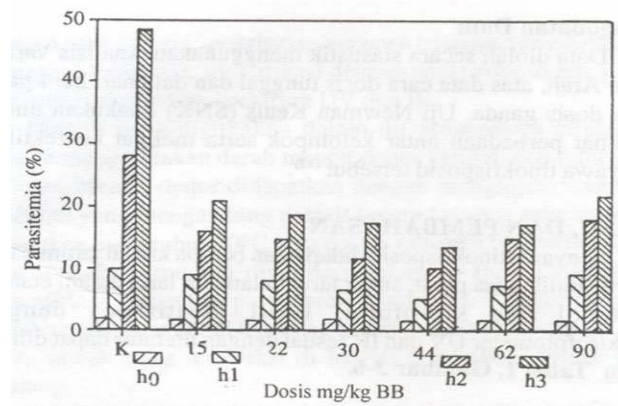
$$(\%) \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$



Gambar 7. Histogram hubungan dosis dengan persentase parasitemia (Metode dosistunggal)

Keterangan :

K = Kontrol terinfeksi *P. berghei* (ANKA) tanpa diobati



Gambar 8. Histogram Hubungan Dosis dengan Persentase Parasitemia (Metode Dosis Ganda)

Keterangan :

K = Kontrol terinfeksi *P. berghei* (ANKA) tanpa diobati

h₀ = Hari 0 persentase parasitemia mencit sebelum diberi senyawa tinokrisposid.

h₁ = Hari 1 persentase parasitemia mencit sesudah pemberian senyawa tinokrisposid ke 1.

h₂ = Hari 2 persentase parasitemia mencit sesudah pemberian senyawa tinokrisposid ke 2.

h₃ = Hari 3 persentase parasitemia mencit sesudah pemberian senyawa tinokrisposid ke 3.

$$(\%) \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Tabel 4. Hasil pengamatan lama hidup mencit terinfeksi *P. Berghei* (ANKA) dengan pemberian senyawa tinokrisposid dosis tunggal.

Dosis (mg/kg BB)	No. Hewan	Hari Kematian Hewan												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
K	1							*						
	2							*						
	3													
15	1							*		*				
	2							*						
	3							*						
22	1							*		*				
	2							*						
	3							*						
30	1										*			
	2										*			
	3										*		*	
44	1											*		*
	2											*		*
	3											*		*
62	1										*		*	
	2										*		*	
	3										*		*	
90	1							*						
	2							*						
	3							*						

Keterangan :

* = Hewan mati

K = Kontrol terinfeksi *P. berghei* (ANKA) tanpa diobati

Tabel 5. Hasil pengamatan lama hidup mencit terinfeksi *P. Berghei* (ANKA) dengan pemberian senyawa tinokrisposid dosis tunggal.

Dosis (mg/kg BB)	No. Hewan	Hari Kematian Hewan														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
K	1							*								
	2							*								
	3						*									
15	1								*							
	2								*							
	3								*							
22	1									*						
	2									*						
	3								*							
30	1													*		
	2													*		*
	3													*		*
44	1														*	*
	2														*	*
	3														*	*
62	1													*	*	
	2													*	*	
	3													*	*	
90	1							*								
	2								*							
	3								*							

Keterangan :

* = Hewan mati

K = Kontrol terinfeksi *P. berghei* (ANKA) tanpa diobati

Pada metode dosis tunggal, persentase parasitemia yang diamati adalah sehari setelah pemberian senyawa uji dan inokulasi parasit. Uji statistik terhadap data yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa tinokrisposid memberikan efek yang berbeda sangat nyata bila dibandingkan dengan kontrol.

Pada metode dosis ganda, persentase parasitemia diamati 24 jam setelah inokulasi parasit sebelum pemberian senyawa tinokrisposid pertama, kemudian 24 jam setelah pemberian senyawa tinokrisposid kedua, dan 24 jam setelah pemberian senyawa tinokrisposid ketiga. Pemeriksaan darah dilakukan setiap hari selama empat hari berturut-turut untuk mengetahui potensi pengaruh tinokrisposid terhadap Plasmodium; ternyata senyawa tinokrisposid dapat menekan pertumbuhan *P. berghei* dalam darah mencit.

Dari grafik hubungan antara dosis dengan persentase parasitemia rata-rata pada cara dosis tunggal (**Gambar 7**) dan cara dosis ganda (**Gambar 8**), terlihat bahwa efek menghambat perkembangan *P. berghei* pada mencit tergantung pada besarnya dosis, sampai dosis 44 mg/kg bb; pada dosis lebih dari 44 mg/kg bb tidak lagi terlihat kenaikan efek bahkan cenderung menurun.

Fenomena seperti ini sering terjadi pada pengujian beberapa obat karena beberapa kemungkinan; pertama misalnya seperti, senyawa kofein pada dosis tertentu berefek stimulan sedangkan pada dosis yang lebih tinggi menjadi berlawanan

yaitu depresan⁽¹⁵⁾. Kemungkinan kedua disebabkan oleh pengaruh farmakokinetik senyawa tinokrisposid yang sifat fisiknya tidak larut dalam air akan mempengaruhi absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi. Kemungkinan ketiga adalah pengaruh enzim metabolisme; tinokrisposid pada dosis kecil belum bisa menginduksi enzim metabolisme sehingga senyawa tinokrisposid tetap aktif menghambat *P. berghei*, sedangkan pada dosis yang lebih besar tinokrisposid akan menstimulasi enzim metabolisme, mengakibatkan senyawa tinokrisposid akan terurai, teroksidasi atau terkonyugasi tergantung apa enzim yang terinduksi, sehingga aktifitasnya akan berkurang atau menjadi tidak aktif.

KESIMPULAN

Senyawa tinokrisposid dapat menekan perkembangan *P. berghei* dalam darah mencit dan memperpanjang hidup mencit yang terinfeksi. Efek optimal diberikan pada dosis 44 mg/kg bb.

SARAN

Perlu dilakukan uji efek tinokrisposid terhadap Plasmodium malaria pada manusia secara *in vitro* dan dilanjutkan dengan uji klinis.

KEPUSTAKAAN

- Adnan AZ. Pemeriksaan dan Isolasi Kandungan Kimia Tumbuhan Brotowali. Dalam : Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat, Rusdi (Penyunting), Pusat Penelitian Universitas Andalas, Padang 1988.
- Depkes RI. Materia Medika, jilid II. Jakarta 1988.
- Depkes RI Penelitian Tanaman Obat di Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia I-II, Jakarta 1988.
- Adnan AZ, Pachaly P. Tinokrisposid, ein neues Furanoditerpenglycosid aus *Tinospora crispa* Miers. Arch Pharm (Weinheim), 1992; 325.
- Adnan AZ, Mukhtar HM, Almahdy. Pemeriksaan Farmakologi Senyawa Furanoditerpenglikosida Baru dari *Tinospora crispa* Miers (Brotowali). Makalah pada Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia VIII, Jakarta, 16-17 Oktober 1995.
- Rochanakij S, Thebtaranonth Y, Yenjai C, Yuthafong Y. Nimbolid A constituent of *Azadirachta indica* inhibits *Plasmodium falcifarum* in culture. Ann Trop Med and Parasitol 1985; 16 (1).
- Malaria Unit Division of Control of tropical Diseases WHO. Ministerial Conference on Malaria, Amsterdam: 26-27 Oktober 1992.
- Bruce-Chatt LJ. Essential Malariologi, London : 1988.
- Brown HW. Dasar-dasar parasitologi Klinik. Edisi III. Diterjemahkan oleh Bintari Rukmono, Gramedia, Jakarta, 1982.
- Peter SW, Richard WHG. Anti malaria Drug. 17-ed. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo: 1984.
- Hawking F, Gammage K, Worms MJ. The Asexual dan Sexual Circadian Rhythms of *Plasmodium vinkel*, *P. chabaodi*, *P. berghei* and *P. gallinaceum*. Parasitol, 1972; 65.
- Depkes RI. farmakope Indonesia, edisi III, Jakarta, 1979.
- Scheffler CW. Statistik Untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran dan Ilmu Bertautan. Terj Suroso, edisi II, Penerbit ITB, Bandung 1987.
- Thomson EB. Drug Bioscreening, Fundamental of Drug Evaluation Tehnnique in Pharmacology. New York : Grace Way Publi Co, 1985.
- Reynolds JEF. Martindale The Extra Pharmacopeia. 30th ed. London : the Pharmaceutical Press, 1872.