

PEMISAHAN FRAKSI DAN SENYAWA-SENYAWA YANG BERKHASIAH ANTIPLASMODIUM DARI EKSTRAK METANOL KULIT KAYU MIMBA (*Azadirachta indica* Juss)

THE SEPARATION OF COMPOUNDS AND FRACTION VIRTUING ANTIPLASMODIUM FROM METHANOL EXTRACTS OF MIMBA TREE BAR (*Azadirachta indica* Juss)

Muhtadi

Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta,
Jl. A. Yani Tromol Pos I Pabelan, Surakarta

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengamati aktivitas antiplasmodium dari ekstrak metanol kulit kayu mimba (*Azadirachta indica*). Fraksi yang diamati adalah fraksi nonpolar, semipolar dan polar yang diperoleh dengan metode kromatografi cair vakum dengan eluen *n*-heksana-etilasetat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi nonpolar memiliki aktivitas antiplasmodium yang paling tinggi terhadap *P. falciparum* strain D10 secara *in vitro*, dengan nilai IC_{50} 6,23 μ g/mL, sedangkan fraksi semipolar dan polar memiliki aktivitas antiplasmodium yang makin menurun, dengan nilai IC_{50} masing-masing 10,25 dan 11,37 mg/mL. Hasil analisis KLT dan uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi nonpolar dan semipolar memiliki kandungan senyawa kelompok triterpenoid, alkaloid dan flavonoid, sedangkan fraksi polar hanya teridentifikasi adanya senyawa flavonoid. Aktivitas antiplasmodium sangat dipengaruhi oleh keberadaan senyawa-senyawa nonpolar (triterpenoid).

Kata Kunci: *Azadirachta indica*, aktivitas antiplasmodium, dan *P. falciparum* strain D10.

ABSTRACT

This research was conducted to evaluate the antiplasmodial activity of *Azadirachta indica* (Mimba) tree bark metanol extracts. The total extracts was fractionated which observed nonpolar, semipolar, and polar fraction,

obtained with vacuum liquid chromatography method. Result of the research indicate that nonpolar fraction have been highest antiplasmodial activity to *P. falciparum* strain D10 by in vitro, with IC_{50} value 6,23 $\mu\text{g/mL}$, while semipolar dan polar fraction have antiplasmodial activity which more decrease activity, with IC_{50} values are 10,25 mg/mL and 11,37 mg/mL , respectively. Based on TLC analysis and phytochemistry test indicate that nonpolar and semipolar fractions have profile chromatogram similar, i.e triterpenoid, alkaloid and flavonoid derivative compounds. Antiplasmodial activity are very influenced by existence of nonpolar compounds in the extracts.

Keywords: *Azadirachta indica*, antiplasmodial activity, and *P. falciparum* strain D10

PENDAHULUAN

Penyakit malaria termasuk penyakit yang dominan dan salah satu penyebab kematian yang besar bagi penduduk di berbagai negara khususnya di wilayah tropis (Saxena, 2003; Snow, 2004; Shulman, 1992), setiap tahunnya lebih dari satu juta manusia meninggal dan sekitar 300-500 juta manusia terinfeksi malaria (Trigg, 1998), serta didukung kecenderungan dan fakta adanya sifat resisten dari *Plasmodium* terhadap beberapa obat antimalaria yang digunakan, sehingga perlu dipikirkan obat alternatif yang potensial. Pemanfaatan obat tradisional dalam pengobatan malaria masih banyak digunakan baik secara empiris dan ilmiah. Kajian obat antimalaria dari bahan alam makin menarik, karena ketersediaan bahan alam yang melimpah di Indonesia dan adanya sifat resistensi dari *Plasmodium* terhadap beberapa obat antimalaria yang digunakan.

Dalam pengobatan malaria, masalah resistensi terhadap obat-obat antimalaria yang terjadi pada *Plasmodium*, terutama *P. falcifarum* yang resisten terhadap kloroquin dan obat-obat antimalaria lain merupakan masalah yang serius (Sutisna, 2004). Oleh karena itu dibutuhkan usaha yang keras untuk mencari dan menemukan obat anti malaria baru dan relatif tidak toksik terhadap manusia.

Pemanfaatan tumbuhan Mimba (*A. indica* Juss) dalam menangani malaria telah dilakukan secara empiris oleh masyarakat secara turun temurun (Heyne, 1987; Isnandar, 2005). Di India, seduhan kulit kayunya digunakan sebagai obat demam yang berselang (naik turun). Kulit kayunya yang pahit dianjurkan untuk tonikum, obat mencret, kudis dan eksim. Rebusan daunnya dapat digunakan untuk membangkitkan selera makan, obat antimalaria dan bila dimasak dengan beras menjadi bubur berkhasiat pada ulcera yang otonis (Heyne, 1987).

Berdasarkan kajian pustaka yang telah dilakukan penelitian tentang Mimba ada sekitar 150 jurnal ilmiah internasional yang telah dilaporkan, sebagian besar masih terbatas untuk pengujian insektisida (Nathan, 2005; Charleston, 2005; Wandscheer, 2004; Boeke, 2004), antikanker (Kumar, 2005; Baral, 2004; Dasgupta, 2004; Nanduri, 2003), antioksidan (Sithisarn, 2005), dan antifungal (Govindachari, 2000) terhadap ekstrak Mimba. Penelitian tentang ekstrak Mimba untuk penanganan malaria untuk penanganan vektor penyebab malaria, seperti untuk penelitian aktivitas insektisida dari ekstrak Mimba (Nathan, 2005; Charleston, 2005; Mishra, 2005; Wandscheer, 2004; Boeke, 2004). Penelitian aktivitas antimalaria dari ekstrak tumbuhan Mimba terhadap *Plasmodium* telah dilaporkan sebelumnya (Tella, 1994; Gessler, 1995; Benoit, 1996; Dhar, 1998). Sedangkan kajian terhadap senyawa murni aktif antimalaria terhadap *Plasmodium* hingga saat ini belum pernah dilaporkan.

Penelitian pendahuluan terhadap tumbuhan Mimba (*A. indica* Juss) telah dilakukan, dan memberikan hasil bahwa ekstrak etanol dari daun Mimba memiliki aktivitas antimalaria yang sangat potensial. Hasil pengujian aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo* dari ekstrak etanol daun Mimba (*Azadirachta indica* Juss) memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan *P. berghei* sebesar 82,39% dengan nilai ED₅₀ sebesar 1,27 mg/Kg BB.

Penelitian ini berfokus pada pemisahan fraksi-fraksi yang potensial dan berkhasiat antiplasmodium dalam ekstrak metanol kulit kayu mimba (*A. indica*). Hasil penelitian ini diharapkan akan memberikan landasan ilmiah yang kuat untuk penggunaan kulit mimba (*A. indica*) sebagai agen fitoterapi, dalam pengobatan malaria.

METODE PENELITIAN

Alat-alat yang akan digunakan terdiri dari; berbagai alat gelas yang biasanya digunakan dalam laboratorium kimia organik, seperangkat alat destilasi, neraca analitik, pengisat gasing hampa R-114 Buchi yang dilengkapi dengan *vaccum system* Buchi B-169, inkubator, mikro pipet, serta seperangkat alat untuk uji aktivitas antiplasmodium.

Bahan kimia yang digunakan terdiri dari berbagai jenis pelarut organik teknis (didestilasi ulang) dan pro-analis yang lazim digunakan dalam laboratorium kimia organik, plat silika gel GF₂₅₄ untuk kromatografi lapis tipis, silika gel GF₂₅₄ untuk kolom vakum dan silika gel 60 untuk kromatografi kolom terbuka, serta bahan untuk uji antimalaria yaitu: pewarna geimsa, natrium sitrat, DMSO dan imersion oil.

Adapun cara penelitian atau langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Pertama, pembuatan ekstrak metanol kulit kayu Mimba. Serbuk kering

kulit kayu mimba yang diperoleh dari penggilingan simplisia, lalu dimaserasi selama 24 jam menggunakan pelarut metanol. Proses maserasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan cara mengganti pelarut metanol tiap 24 jam sekali. Masing-masing hasil penyaringan dari maserasi dievaporasi dan dikeringkan untuk mendapatkan berat rendemen ekstrak total metanolnya.

Kedua, fraksinasi ekstrak metanol kulit kayu mimba dengan KCV. Ekstrak kental metanol kulit kayu mimba (seberat 25 g) dilarutkan lagi kedalam pelarut aseton secukupnya, selanjutnya diimpregnasi kedalam silika G₆₀ (mesh 30-70 mesh). Kemudian sampel yang terimpregnasi dimasukkan kedalam kolom kromatografi cair vakum, dan dielusi dengan pelarut mulai n-heksana:etilasetat = 1:1, 4:6, 2:8, etilasetat 100% dan metanol:etilasetat = 8:2. Masing-masing fraksi ditampung sebanyak 150 mL, dan setelah dipekatkan ditotolkan pada plat KLT silika GF₂₅₄, dan dianalisis untuk dilakukan penggabungan fraksi-fraksi yang memiliki profil kromatogram yang mirip.

Ketiga, uji aktivitas antiplasmodium. Suspensi sel darah merah yang telah terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* strain D10, didistribusikan secara merata pada flask dalam kondisi aseptis lalu ditambahkan *malaria culture medium* (MCM) dan 10%-15% serum manusia golongan O. Kultur diletakkan pada *candle jar* dan diinkubasi pada suhu 37 °C. Selama masa pengkulturan dan inkubasi, media kultur diganti tiap 24 jam sekali. Preparat mikroskopik dibuat dengan pewarna giemsa 10% selama 15 menit. Pembuatan preparat mikroskopik ditujukan untuk memonitor tingkat pertumbuhan *Plasmodium falciparum*. Ketika parasit berkembang antara 1,5%-2% maka sudah siap digunakan dalam uji aktivitas antiplasmodium setelah melalui proses sinkronisasi.

Pengujian aktivitas antiplasmodium fraksi-fraksi ekstrak metanol kulit kayu mimba dilakukan secara *in vitro* terhadap kultur *Plasmodium falciparum* strain D10 yang telah disinkronisasi menggunakan sorbitol 5%. Sinkronisasi ini untuk mendapatkan fase eritrosit awal dari *Plasmodium falciparum* yaitu *ring stage*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 2% parasitemia dengan penambahan serum manusia 12,5%. Penggunaan persen parasitemia yang relatif rendah ini sesuai dengan kenyataan bahwa hal ini akan semakin meningkatkan jumlah infeksi *Plasmodium falciparum* selama kultur *in vitro* (Schuster, 2002). Sedangkan penggunaan serum sebesar 12,5% berdasarkan pada saat kultur *Plasmodium falciparum* strain D10 yang dapat tumbuh optimal dengan penambahan serum sebesar 12,5%. Pengujian dilaksanakan secara *triplikat* (3 kali replikasi) dengan lama inkubasi 48 jam. Lama waktu inkubasi ini sesuai dengan lama fase eritrosit dari *Plasmodium falciparum*, yaitu 48 jam (Wijayanti, 2007). Analisis hasil uji aktivitas antiplasmodium adalah dengan membuat preparat apusan tipis eritrosit dengan pewarna giemsa 5% selama 30 menit. Kemudian dihitung jumlah para-

sitemia terhadap ± 1000 eritrosit dengan bantuan mikroskop perbesaran 1000 x (Souri *et al.*, 2002). Masing-masing replikasi perlakuan dibuat apusan tipis dan dihitung jumlah sel eritrosit terinfeksi dibandingkan dengan ± 1000 sel eritrosit. Penghitungan dimulai ketika dalam satu lapangan pandang terdapat sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*. Sel eritrosit terinfeksi yang dihitung adalah yang menunjukkan *Plasmodium falciparum* yang memiliki inti sel dan sitoplasma pada fase *ring stage* dan sel eritrosit yang telah terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* pada stadium lanjut (skizon).

Keempat, analisis KLT dan uji Fitokimia. Analisis kandungan kelompok senyawa di dalam masing-masing fraksi dilakukan dengan analisis KLT, dengan pendeteksi UV 254 nm, 366 nm, dan beberapa penampak noda yang lazim digunakan di dalam analisis kandungan senyawa triterpenoid, alkaloid, saponin dan flavonoid. Eluen (fase gerak) yang dipilih adalah yang memberikan Rf tertinggi = 0,8 dan Rf terendah = 0,2, yang digunakan dalam penelitian ini yakni kloroform:etilasetat = 8:2.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi dan Partisi

Hasil maserasi kulit kayu mimba setelah dikeringkan diperoleh sebagai rendemen, yaitu perbandingan berat ekstrak yang diperoleh dengan berat simplisia awal. Dari perhitungan diperoleh rendemen yang sebesar 10,67%, dengan berat ekstrak metanol sebanyak 480 gram.

Ekstrak metanol kulit kayu mimba selanjutnya difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum, dimulai dengan pelarut n-heksana-etilasetat dan terakhir dielusi dengan metanol-etilasetat (8:2). Kemudian masing-masing fraksi dikeringkan dengan evaporator, lalu dianalisis dengan uji KLT dan digabungkan berdasarkan kemiripan profil kromatogramnya, diperoleh 4 fraksi gabungan, yaitu fraksi I (1,2), A (3 s.d 7), B (8 s.d 11) dan C (12 s.d 16). Hasil analisis KLT dengan fase gerak kloroform : metanol = 9:1 ditunjukkan pada Gambar 1.

Hasil Uji Aktivitas Antiplasmodium

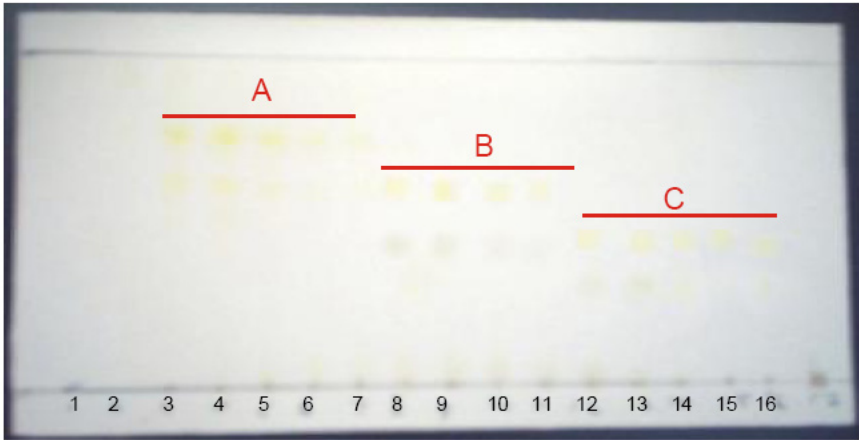
Pengujian aktivitas antiplasmodium fraksi-fraksi dari ekstrak etanol kulit kayu mimba dilakukan secara *in vitro* terhadap kultur *Plasmodium falciparum* strain D10 yang telah disinkronisasi menggunakan sorbitol 5%. Masing-masing replikasi perlakuan dibuat apusan tipis dan dihitung jumlah sel eritrosit terinfeksi dibandingkan dengan ± 1000 sel eritrosit. Penghitungan jumlah *Plasmodium falciparum* dalam preparat apusan tipis dilakukan di bawah pengamatan

mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan bantuan minyak imersi. *Plasmodium falciparum* yang dihitung adalah yang memiliki inti dan sitoplasma serta *Plasmodium falciparum* yang telah memasuki stadium lanjut (skizon) Gambar 2.

Persen pertumbuhan parasitemia pada kontrol dan kelima konsentrasi kulit kayu mimba dihitung menurut rumus:

$$\text{Persen parasitemia (\%)} = (\text{eritrosit terinfeksi} / \pm 1000 \text{ eritrosit}) \times 100\%$$

(Wijayanti, 2007).



Gambar 1. Profil KLT Hasil KCV dengan Fase Gerak Kloroform: Metanol (9:1) dan Deteksi dengan Serum Sulfat

Berdasarkan profil KLT hasil KCV tersebut maka dilakukan penggabungan fraksi seperti tabel 1 berikut :

Tabel 1. Hasil Penggabungan Fraksinasi dari KCV Ekstrak Awal & Beratnya

No.	Fraksi-fraksi	Fraksi gabungan	Berat (g)
1.	1,2	-	Tidak ditimbang
2.	3 s.d 7	A	3,36
3.	8 s.d 11	B	0,82
4.	12 s.d 16	C	1,54

Dari data pertumbuhan parasitemia kemudian ditentukan besar persen penghambatan menggunakan rumus :

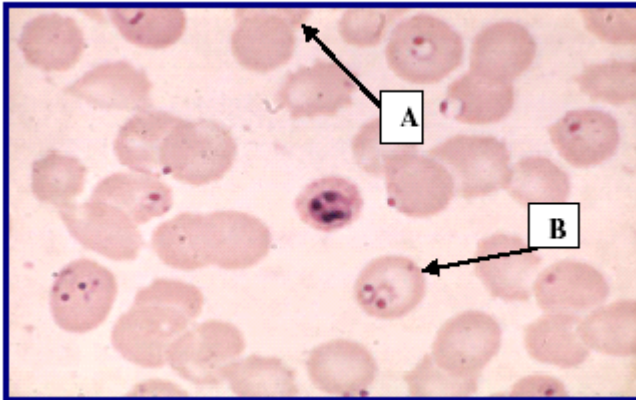
$$\text{Persen penghambatan (\%)} = 100\% - \left(\frac{\text{testparasitemia}}{\text{kontrolparasitemia}} \right) \times 100\%$$

(Souri *et al.*, 2002).

Hasil penghitungan persen pertumbuhan parasitemia ditunjukkan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Persentase Rata-rata Pertumbuhan Parasitemia

Perlakuan (µg/mL)	Persen Rata-rata Pertumbuhan		
	Fraksi A (%)	Fraksi B (%)	Fraksi C (%)
Kontrol	12,56	12,93	12,32
3,125	9,12	8,98	8,87
6,25	6,08	7,34	6,77
12,5	5,53	6,25	5,68
25	4,02	5,00	5,25
50	3,46	3,21	3,48



Gambar 2. Sel Eritrosit Normal (A) dan Terinfeksi (B) pada Perbesaran 1000 x

Data rata-rata persen pertumbuhan *Plasmodium falciparum* menunjukkan penurunan seiring dengan bertambahnya konsentrasi masing-masing fraksi. Persen pertumbuhan tertinggi diperoleh dari perlakuan kontrol yaitu perlakuan tanpa ekstrak atau fraksi, sedangkan persen pertumbuhan terendah pada perlakuan 50 μ g/mL. Histogram perlakuan vs persen pertumbuhan ditampilkan pada Gambar 3. Dari persen pertumbuhan ini kemudian dapat dihitung persen penghambatan parasitemia.

% pertumbuhan

Gambar 3. Histogram Persentase Pertumbuhan Parasitemia terhadap Perlakuan Masing-masing Fraksi

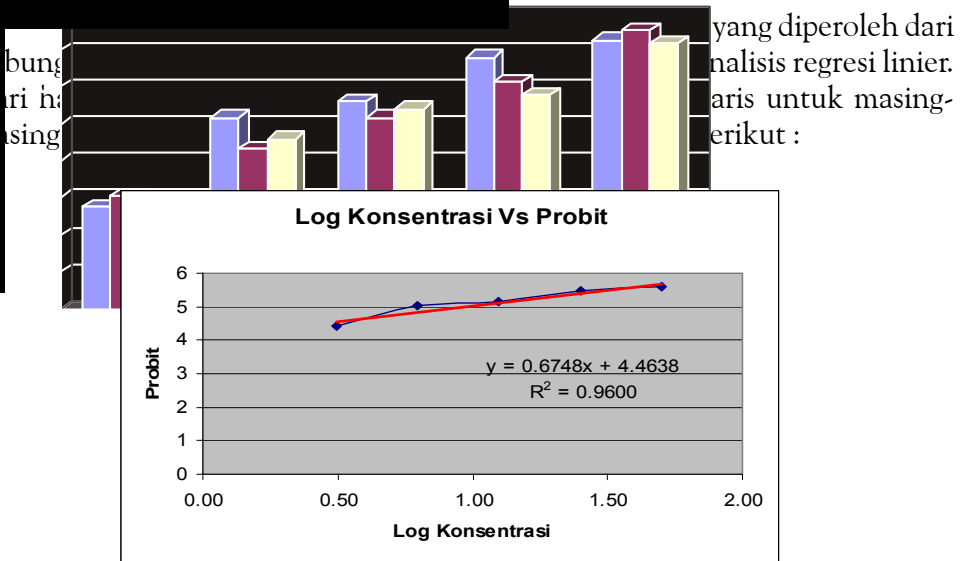
Persen penghambatan kemudian diubah ke angka probit. Angka probit yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada tabel probit (Mursyidi, 1985). Besarnya persen penghambatan dan angka probitnya tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Persen Penghambatan Parasitemia dan Angka Probitnya

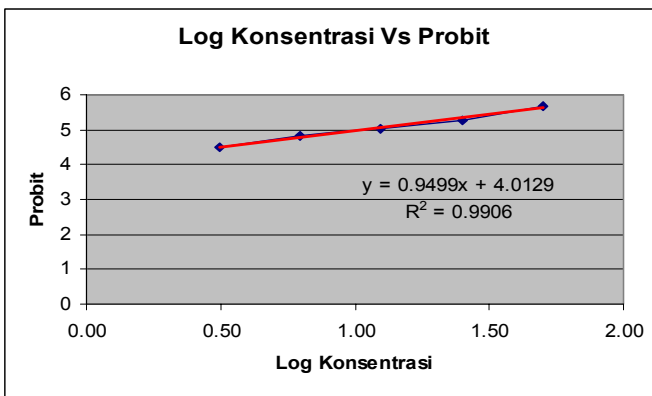
μ .

Data persen penghambatan *Plasmodium falciparum* menunjukkan kenaikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi masing-masing fraksi. Persen penghambatan tertinggi diperoleh dari perlakuan fraksi B pada konsentrasi 50 mg/mL. Histogram perlakuan vs persen penghambatan parasitemia ditunjukkan pada Gambar 4.

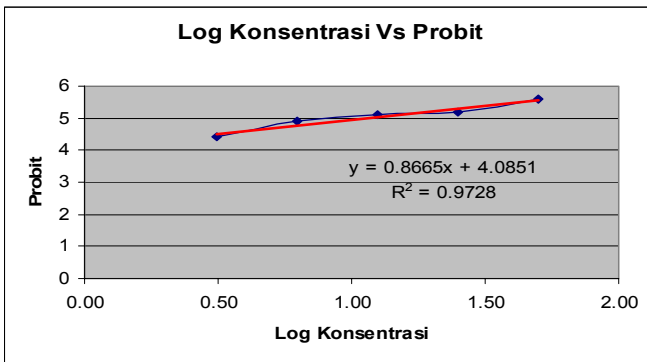
Gambar 4. Histogram Persentase Penghambatan Parasitemia terhadap Perlakuan Masing-masing Fraksi



Gambar 5. Grafik persamaan regresi fraksi A (nonpolar)



Gambar 6. Grafik persamaan regresi fraksi B (semipolar)



Gambar 7. Grafik Persamaan Regresi Fraksi C (Polar)

Berdasarkan analisis persamaan regresi dari ketiga grafik tersebut, maka dapat dihitung nilai IC_{50} dari masing-masing fraksi, seperti dalam Tabel 4.

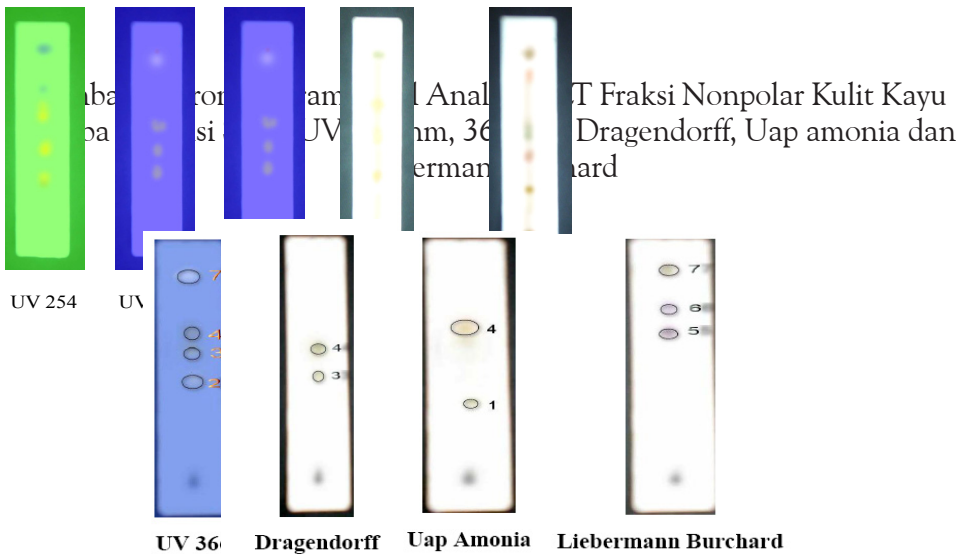
Tabel 4. Analisis Persamaan Regresi dan Nilai IC_{50} Masing-masing Fraksi

No.	Fraksi	Persamaan regresi	Nilai R^2	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1.	Fraksi A	$Y = 0,6748X + 4,4638$	0,9600	6,23
2.	Fraksi B	$Y = 0,9499X + 4,0129$	0,9906	10,25
3.	Fraksi C	$Y = 0,8665X + 4,0851$	0,9728	11,37

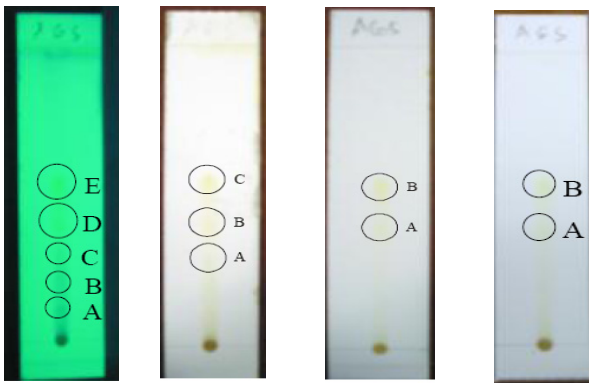
Dari Tabel 4, diperoleh petunjuk bahwa aktivitas antiplasmodium yang paling tinggi adalah fraksi A (nonpolar) dari ekstrak metanol kulit kayu mimba, sedangkan fraksi B dan C memiliki aktivitas antiplasmodium yang makin menurun, walaupun dengan perbedaan nilai IC_{50} yang kecil. Nilai aktivitas antiplasmodium dari semua fraksi yang diuji masih di bawah $25 \mu\text{g/mL}$, menurut O'Neill *et al.* (1985) masuk dalam kategori sangat aktif.

Analisis KLT untuk Pengujian Fitokimia

Uji kualitatif KLT ini untuk memperoleh gambaran, senyawa apa saja yang terkandung di dalam fraksi-fraksi ekstrak metanol kulit kayu mimba. Berdasarkan analisis KLT ini, akan dapat memberikan petunjuk senyawa-senyawa apa saja yang kemungkinan memiliki aktivitas antiplasmodium.



Gambar 9. Kromatogram Fraksi Semipolar Ekstrak Metanol Kulit Kayu Mimba Deteksi Sinar UV 366 nm, Dragendorff, Uap Amonia dan Liebermann Burchard



UV 254

Uap amonia

Dragendorff

Liebermann Burchard

Gambar 10. Kromatogram Fraksi Polar Dari Ekstrak Metanol Kulit Kayu Mimba Deteksi Dengan Sinar UV 254 nm, Uap Amonia, Dragendorff dan Liebermann Burchard

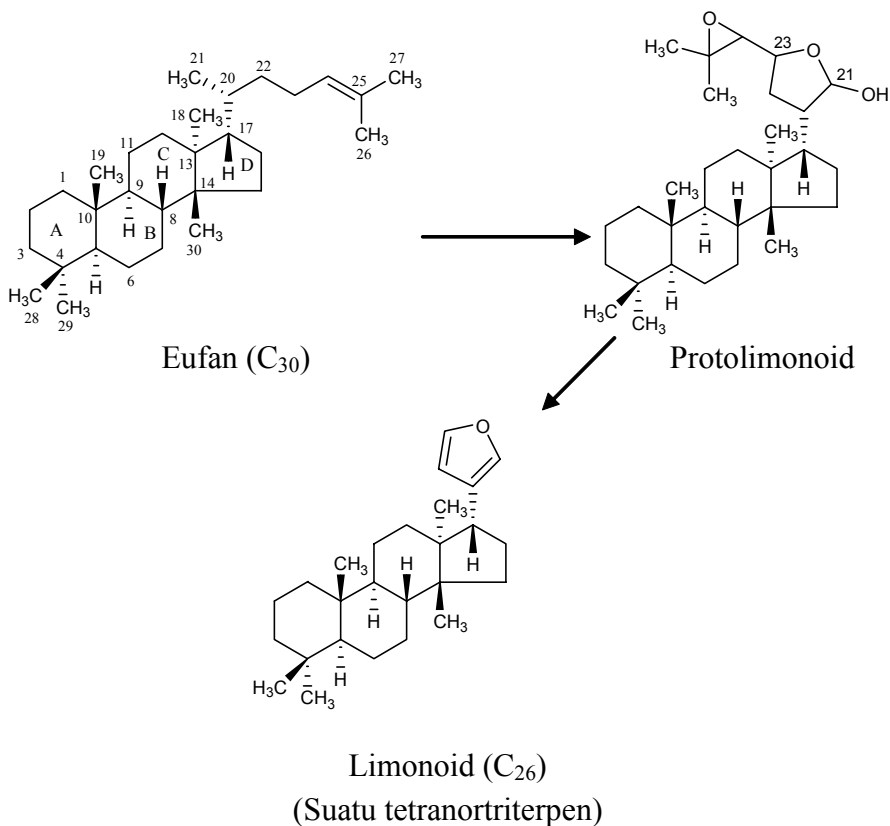
Berdasarkan analisis KLT dan identifikasi kandungan senyawa dengan beberapa pereaksi uji fitokimia, diperoleh petunjuk bahwa ekstrak metanol kulit kayu mimba memiliki kandungan senyawa triterpenoid, alkaloid dan flavonoid, sedangkan pada fraksi polar (C) hanya teridentifikasi adanya senyawa flavonoid. Selengkapnya seperti Tabel 5 berikut :

Tabel 5. Perbandingan Kandungan Kimia Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol Kulit Batang Mimba

No	Fraksi Nonpolar Eluen CHCl ₃ :EtOAc (8:2)		Fraksi Semipolar Eluen CHCl ₃ :EtOAc (8:2)		Fraksi Polar Eluen CHCl ₃ :EtOAc (9,5:0,5)		
	Rf	Senyawa	Rf	Senyawa	Rf	Senyawa	
1	0,5	alkaloid	0,55	alkaloid	0,275	flavonoid	
2	0,5		0,65		0,4		
3	0,625	flavonoid	0,375	flavonoid			
4	0,975		0,725	triterpenoid			
5	0,625	triterpenoid					
6	0,825						

Berdasarkan kajian pustaka, dari segi kimia tumbuhan Famili Meliaceae terutama dicirikan oleh senyawa-senyawa turunan limonoid, suatu triterpenoid yang bersifat nonpolar. Senyawa-senyawa limonoid (C_{26}) ini secara biogenetik berasal dari triterpen tetrasiklik jenis eufan (C_{30}), via protolimonoid, mengalami serangkaian reaksi oksidasi dan penataan ulang. Perubahan ini, secara garis besar tercantum pada Bagan 1.

Melia azedarach berasal dari Himalaya dan Iran, sedangkan *M. azadirachta* berasal dari India. Kedua spesies ini, bersama-sama dengan *Azadirachta indica* A. Juss. seringkali dianggap sama (Cronquist, 1981). Berdasarkan hasil kajian pustaka dilaporkan bahwa dari *M. azedarach* atau *M. azadirachta* atau *Azadirachta indica*, telah ditemukan sejumlah besar senyawa limonoid, dan senyawa-senyawa



Bagan 1. Transformasi Kerangka Eufan Menjadi Limonoid Via Protolimonoid
(Achmad, 2007)

lain meliputi senyawa flavonoid, ksanton, antrakuinon, alkaloid, steroid dan monoterpen (Achmad, 2007).

Fraksi yang paling aktif dalam uji antiplasmodium adalah fraksi nonpolar (fraksi A) dengan nilai IC_{50} 6,23 μ g/mL, dan berdasarkan analisis KLT memiliki kandungan senyawa terpenoid yang lebih banyak disamping senyawa flavonoid dan alkaloid. Hal ini dimungkinkan, karena dari *M. azedarach* telah dilaporkan penemuan sejumlah besar senyawa-senyawa limonoid, salah satunya merupakan senyawa turunan gedunin, yang mempunyai kerangka karbon yang berasal dari pemutusan ikatan pada cincin D. Misalnya, senyawa gedunin dan 7-deasetil-7-oksogedunin, diperoleh dari buah *M. azedarach* (Okogun, 1975).

Gedunin adalah salah satu senyawa triterpenoid, dan telah diteliti memiliki aktivitas antimalaria tiga kali lebih kuat dari kloroquin tetapi duapuluh kali lebih lemah dari quinin. Perbandingan aktivitas gedunin dan dihidrogedunin menunjukkan bahwa reduksi ikatan rangkap dalam gugus α , β -keton takjenuh berperan menurunkan aktivitas dan meningkatkan toksisitasnya (Bray, 1990).

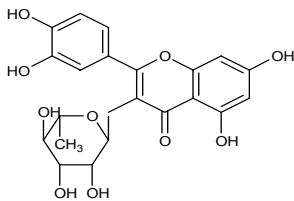
Sedangkan pada fraksi semipolar (fraksi B), berdasarkan analisis KLT dan uji fitokimia mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan terpenoid; memiliki nilai IC_{50} 10,25 mg/mL, memberikan petunjuk bahwa adanya kandungan senyawa alkaloid dan flavonoid memberikan kecenderungan menurunkan efek antiplasmodiumnya, walaupun keberadaan kedua kelompok senyawa tersebut masih mengindikasikan efek antiplasmodium yang aktif (<25 mg/mL). Beberapa senyawa alkaloid yang telah dilaporkan memiliki efek antiplasmodium adalah kelompok **bisbenzilisoquinon** yang dinamakan (+)-2-N-metyltelobin bersama 15 alkaloid dari golongan yang sama seperti (+)-dihydrotelobine, yang diisolasi dari spesies *Stephania erecta*. Semua alkaloid yang diisolasi dari spesies ini aktif terhadap *P. falciparum* yang resisten terhadap kloroquin (Likhitwitayawuid, 1993).

Berdasarkan penelusuran pustaka, dilaporkan dari tumbuhan *M. azedarach* telah diperoleh beberapa senyawa alkaloid jenis β -karbolin, antara lain adalah 4-metoksi-1-vinil- β -karbolin dan 4,8-dimetoksi-1-vinil- β -karbolin (Kwon, 1999). Kemungkinan senyawa-senyawa ini dan turunannya yang bersifat antiplasmodium dalam pengujian *in vitro*nya.

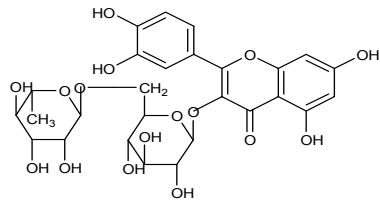
Fraksi yang paling polar (fraksi C), teridentifikasi mengandung senyawa flavonoid dan memiliki efek antiplasmodium yang juga tinggi pada kategori O'Neill dengan nilai IC_{50} 11,37 g/mL (nilai IC_{50} jauh dibawah 25 g/mL). Berdasarkan kajian pustaka, beberapa senyawa flavonoid dan ksanton yang mempunyai aktivitas antimalaria telah banyak diisolasi dari tumbuhan, misalnya exiguaflavone A dan exiguaflavone B yang diisolasi dari spesies *Artemisia indica* yang sangat aktif terhadap strain *Plasmodium* yang resisten kloroquin dengan IC_{50} berturut-turut $1,08 \times 10^{-5}$ g/mL dan $1,60 \times 10^{-5}$ g/mL (Champhen, 1998).

Dari ekstrak etanol daun *M. azedarach* ditemukan beberapa senyawa flavonoid, kelompok glikosida kuercetin, yaitu kuercetin-3-O-L-rutinosida atau kuercitrin dan kuercetin-3-O-rutinosida atau rutin (Nair, 1975). Dari ekstrak kulit kayu *M. azedarach* ditemukan 4,8-dimetoksi-1-vinil- β -karbolin dan apigenin 7-O-L-ramnopyranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranosida (Xu, 1992). Disamping itu, tumbuhan *M. azedarach* diketahui memproduksi pula beberapa senyawa aromatik jenis lainnya. Misalnya, dari kulit *M. azedarach* ditemukan senyawa ksanton, yang diberi nama meliansanton (Yang, 1998). Keberadaan senyawa-senyawa flavonoid dan ksanton dalam ekstrak metanol kulit kayu mimba, khususnya pada fraksi yang polar inilah yang dimungkinkan memiliki efek antiplasmodium yang tinggi (aktif).

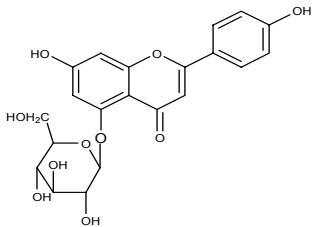
Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi masing-masing senyawa khususnya senyawa-senyawa triterpenoid dalam fraksi nonpolar (A), sangat penting untuk dilakukan. Akan tetapi, keberadaan senyawa-senyawa alkaloid dan flavonoid yang telah teridentifikasi pada analisis KLT & uji fitokimia,



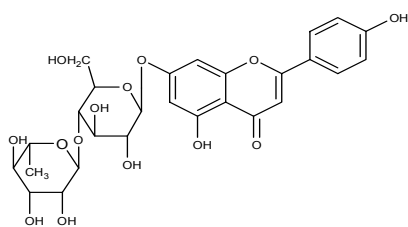
Quercetin



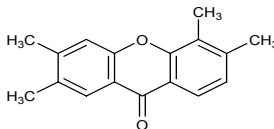
Rutin



Apigenin 5-O- β -D-galaktopiranosida



Apigenin 7-O- α -L-ranpironasil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranosida



Meliansanton

yang juga memiliki aktivitas yang aktif (potensial) dalam uji antiplasmodium secara *in vitro* sangat penting juga untuk dipisahkan dan diteliti lebih lanjut.

Belum adanya laporan penelitian tentang efek antiplasmodium secara *in vitro* & *in vivo* dari senyawa-senyawa hasil isolasi dari ekstrak kulit kayu mimba membuka peluang untuk mengungkapkan lebih jauh dengan dilengkapi kajian toksisitasnya secara akut dan subkronis, akan memberikan gambaran dan landasan ilmiah yang kuat dalam pemanfaatannya sebagai agen fitoterapi antimalaria.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Aktivitas antiplasmodium secara *in vitro* dari fraksi A (nonpolar) dari ekstrak metanol kulit kayu mimba (*A. indica*) paling tinggi dibandingkan fraksi B (semipolar) dan C (polar), dengan nilai IC_{50} sebesar 6,23 mg/mL

2. Hasil analisis KLT untuk pengujian fitokimia, disimpulkan kandungan senyawa-senyawa kimia yang ada dalam fraksi A, B dan C adalah kelompok senyawa golongan triterpenoid, alkaloid dan flavonoid.
3. Berdasarkan analisis kualitatif, maka senyawa-senyawa triterpenoid yang terkandung dalam fraksi nonpolar (A) dari ekstrak metanol kulit kayu mimba paling berpotensi sebagai antimalaria. Akan tetapi, senyawa-senyawa flavonoid dan alkaloid dalam ekstrak metanol kulit kayu mimba juga memiliki efek antiplasmodium yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., Hakim, E.H, Syah, Y.M., Juliawaty, L.D., Makmur, L. 2007. *Fitokimia Tumbuhan Obat Indonesia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Baral, R., Chattopadhyay, U., 2004. "Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Mediated Immune Activation Caruses Prophylactic Growth Inhibition of Murine Ehrlich Carcinoma and B16 Melanoma", ***International Immunopharmacology***, Vol 4, pP. 355-366.
- Benoit, F, Valentin, A., Pelissier, Y., Diafouka, F, Marion, C., Kone-Bamba, D., Mallie, M., Yapo, A., Bastide, J.M., 1996. "Antimalarial Activity *in Vitro* of Vegetal Extracts Used in West African Traditional Medicine". ***American Journal of Tropical medicine and Hygiene***, Vol. 54, pP. 67-71.
- Boeke, S.J., Boersma, M.G., Alink, G.M., Loon, J.J.A.V., Huis, A.V., Dicke, M., Rietjens, I.M.C.M. 2004. "Safety Evaluation of Neem (*Azadirachta indica*) Derived Pesticides", ***Journal of Ethnopharmacology***, Vol. 94, pP. 25-41.
- Bray, D. H., Warhurst, D. C., Connolly, J. D., O'Neill, M. J. and Phillipson, J. D. 1990. "Plants as Source of Antimalarial Drug. Pt.7 Activity of Some Species of Meliaceae Plants and Their Constituent Limoids", ***Phytother. Res.***, Vol. 4, pp. 29–35.
- Chanphen, R., Thebtaranonth, Y., Wanauppathamkul, S. and Yuthavong, Y. 1998. "Antimalarial Principles from *Artemisia indica*", ***J. Nat. Prod.***, Vol. 61, pp. 1146–1147.
- Charleston, D.S., Kfir, R., Dicke, M., Vet, L.E.M. 2005. "Impact of Botanical Pesticides Derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the Biology of Two Parasitoid Species of the Diamondback Moth", ***Biological Control***, Vol. 33, pP. 131-142.

- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press, hal. 813-815.
- Dasgupta, T., Banerjee, S., Yadava, P.K., Rao, A.R. 2004. "Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Extract in Murine Carcinogenesis Model Systems", **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 92, pP. 23-36.
- Dhar, R., Zhang, K., Talwar, G.P., Garg, S., Kumar, N. 1998. "Inhibition of The Growth and Development of Asexual and Sexual Stages of Drug-Sensitive and Resistant Strains of The Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) Fractions", **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 61, pP. 31-39.
- Gessler, M.C., Tanner, M., Chollet, J., Nkunya, M.H.H. 1995. "Tanzanian Medicinal Plants Used Traditionally for The Treatment of Malaria: *In Vivo* Antimalarial and *In Vitro* Cytotoxic Acitivities", **Phytotherapy Research**, Vol. 9, pP. 504-508.
- Govindachari, T.R., Suresh, G., Gopalakrishnan, G., Masilamani, S., Banumathi, B. 2000. "Antifungal Activity of some Tetranortriterpenoids", **Fitoterapia**, Vol. 71, pP. 317-320.
- Heyne, (1987), *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, diterjemahkan oleh Badan Libang Kehutanan Jakarta. Jakarta: Yayasan Sarana Warna Jaya.
- Isnandar, H.W. 2005. *Kumpulan 1001 Ramuan Obat Tradisional Indonesia*. Sidoarjo: PJ Dayang Sumbi.
- Kumar, S., Suresh, P.K., Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Arunakaran, J., (2005), Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3), **Journal of Ethnopharmacology**, article in press.
- Kwon, H.C., Lee, B.G., Kim, S.H., Jung, C.M., Hong, S.Y., Han, J.W., Lee, H.W., Zee, O.P., Lee, K.R. (1999). Induceable nitric oxide synthase inhibitors from *Melia azedarach* var. *japonica*, *Archives of Pharmacal Research*, 22(4), 410-413; CAN 131:334572, AN 1999:602975, CAPLUS (ACS on SciFinder ®).
- Mishra, V., Parveen, N., Singhal, K.C., Khan, N.U., (2005), Antifilarial activity of *Azadirachta indica* on cattle filarial parasite *Setaria cervi*, **Fitoterapia**, Vol. 76, pP. 54-61.
- Nanduri, S., Thunuguntla, S.S.R., Nyavanandi, V.K., Kasu, S., Kumar, P.M., Ram, P.S., Rajagopal, S., Kumar, R.A., Deevi, D.S., Rajagopalan, R.,

- Venkateswarlu, A., (2003), Biological investigation and structure-activity relationship studies on azadirone from *Azadirachta indica* A. Juss, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 13, pP. 4111-4115.
- Nathan, S.S., Kalaivani, K., Murugan, K., (2005), Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culcidae), **Acta Tropica**, Vol. 96, pP. 47-55.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardmann, P., Phillipson, J.D. and Warhurst, D.C., 1985, Plants as Source of Antimalarial Drugs Part 1, *In vitro* Method for the Evaluation of Crude Extracts from Plants, **Planta Med.**, 51, 394-398 in: Köhler, I., Siems, K.J., Siems, K., Hernández, M.A., Ibarra, R.A., Berendsohn, W.G., Bienzle, U., Eich, E., 2002, In vitro Antiplasmodial Investigation of Medicinal Plants from El Salvador, **Z. Naturforsch.**, 57c, 277-281.
- Okogun J.I., Fakunle, C.O., Ekong, D.E.U., Connoly, J.D. (1975). Chemistry of the Meliacins (Limonoids). Structure of melianin A, a new protomeliacin from *Melia azedarach*, **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: Organic & Bioorganic Chem.**, 14, 1352-1356.
- Saxena S., Neerja Pant, D.C. Jain and R.S. Bhakuni, 2003, Antimalarial Agents from Natural Sources, **Current Science**, Vol. 85, No 9, pp; 1314-1329.
- Schuster, F.L., 2002, Cultivation of *Plasmodium* spp., **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 15, No. 3, pp 355-364.
- Shulman S.T., John P.D., and Herbert M.S., (1992), *Dasar Biologi dan Klinis Penyakit Infeksi*, Penerjemah, Soeprapto S., Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, Indonesia.
- Sithisarn, P., Supabphol, R., Gritsanapan, W., (2005), Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209), **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 99, pP. 109-112.
- Snow R.W., Craig M.H., Dechman U., Lesueur D., Parasitol, In Vagapandu S., Sandeep S., Meenakshi J., Savita S., Prati D.S., Chaman L.K. and Rahul J., (2004), 8-Quinolinalinines Conjugated with Amino Acid are Exhibiting Potent Blood Schizontocidal activities, **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Vol. 12, pP. 239-247.
- Souri, E., Nateghpour, M., Farsam, H., Kaji, Z., Hamedi, Y., and Amanlou, M., 2002, In Vitro Activity of Mefloquine and Its Enantiomers against

- Tella, A., (1994), Studies on *Azadirachta indica* in malaria, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 58. pP. 318.
- Trigg P.I., A.V. Kondrachine, (1998), *The Current Global Malaria Situation*, In Irwin W. Sherman, *Malaria Parasite Biology, Phatogenesis and Protection*, ASM Press, Washington, DC, pP. 11-22.
- Wandscheer, C.B., Duque, J.E., da Silva, M.A.N., Fukuyama, Y., Wohlke, J.L., Adelman, J., Fontana, J.D., (2004), Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*, *Toxicon*, Vol. 44, pP. 829-835.
- Wijayanti, M.A., Sholihah, E.N., Tahir, M., Hadanu, R., Jumina, Supargiyono, and Mustofa, 2006, Antiplasmodial Activity and Acute Toxicity of *N*-alkyl and *N*-benzyl-1,10- Phenanthroline Derivates in Mouse Malaria Model, *Journal of Health Science*, 52 (6), 794-799.
- Xu, R., Lin, W., Han, J., Wang, W., Zao, S. (1992). Studies on the chemical constituents of *Melia azedarach*, *J. Chinese Pharm. Sci.*, 1(2), 7-11; CAN 119:45222; AN 1993:445222, CAPLUS (ACS on SciFinder ®).
- Yang, G., Chen, Y., Zhang, S., Zhu, Z. (1998). Studies on the chemical constituents of the bark of *Melia azedarach* L., *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa (China)*, 10(4), 45-47; CAN 130:356986, AN 1999:180101, CAPLUS (ACS on SciFinder ®).