

## Penapisan Senyawa Antimalaria yang Berasal dari Tumbuhan

SYAMSUDIN\*

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila  
Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640

Diterima 18 Desember 2007, Disetujui 26 Februari 2008

**Abstract:** Efforts to discover and develop new antimalarial drugs have increased dramatically in recent years mainly because of the parasites' resistance to existing antimalarial drugs. Selection of drug candidates for clinical trials in man and the design of clinical protocols are based upon consideration of data from a battery of preclinical test systems. All compounds are assessed initially in one or more primary models. A compound which is considered active by well established criteria in primary screening test is considered for further evaluation in successively more rigorous clinical test. At the end of each stage of testing, a decision is taken to advance the compound to the next stage or to discontinue it. Primary screening tests should have optimal sensitivity, a high degree of reproducibility, high throughput, should require a minimum quantity of test compound and bear low cost. As there is growing need for newer and more efficacious antimalarial drugs especially in tropical countries, more sensitive and economical screening models are needed. This review is an update of various conventional and latest *in vitro* and *in vivo* screening methods being used for evaluation of antimalarial compounds.

**Keywords:** antimalarial drugs, screening models, *in vitro*, *in vivo*.

### PENDAHULUAN

DI ANTARA faktor utama penyebab kegagalan dalam pemberantasan malaria adalah timbulnya vektor malaria, yaitu nyamuk Anopheles, yang resisten terhadap insektisida, dan parasit, yaitu Plasmodium, yang resisten terhadap antimalaria yang tersedia. Resistensi Plasmodium, khususnya *Plasmodium falciparum* telah menjadi masalah yang serius dan mengawatirkan dewasa ini, karena mengakibatkan terjadinya kegagalan dalam pengobatan bahkan kematian. Hal ini telah mendorong para peneliti untuk berupaya menemukan antimalaria baru guna menggantikan antimalaria yang sudah tidak efektif lagi. Upaya untuk menemukan antimalaria baru terus dilakukan, salah satunya melalui eksplorasi senyawa aktif dari bahan obat alam, terutama tanaman obat yang secara tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati malaria di berbagai daerah endemik di dunia<sup>(1)</sup>.

Upaya menemukan antimalaria baru melalui eksplorasi terhadap tanaman obat telah dilakukan secara sangat intensif pada beberapa dasawarsa terakhir ini oleh beberapa peneliti di dunia.

Beberapa senyawa baru yang mempunyai aktivitas antiplasmodial telah berhasil diisolasi dari tanaman obat yang secara tradisional digunakan oleh masyarakat di berbagai negara untuk melawan infeksi *P. falciparum*.

Tumbuhan obat terbukti merupakan salah satu sumber bahan baku antimalaria karena beberapa senyawa aktif yang terkandung di dalam tumbuhan tersebut memiliki efek antimalaria. Untuk mendapatkan obat antimalaria dari tumbuhan diperlukan suatu cara pengujian yang memadai mulai dari uji pre-skrining, uji skrining secara *in vitro* dan *in vivo*, dan berpuncak pada uji klinis.

### TEKNIK PENGUJIAN ANTIMALARIA SECARA *IN VITRO*

Beberapa metoda telah dikembangkan untuk mengetahui pengaruh obat terhadap *P. falciparum* secara *in vitro*, antara lain metoda yang dikembangkan oleh Rieckmann. Dalam metoda ini sampel darah dari penderita ditambahkan ke dalam *microplate* yang mengandung obat dengan beberapa dosis<sup>(2)</sup>. Kerugian dari teknik ini hanya dapat mengamati parasit di dalam stadium cincin yang bersirkulasi di dalam darah tepi, dan kesimpulan diambil dengan mengukur hambatan maturasi pada stadium *schizon*

\* Penulis korespondensi, Tlp. 081315549694  
e-mail: syamsudin27@yahoo.com

dari parasit.

Metoda yang saat ini sering digunakan adalah yang dikembangkan oleh Desjardins *et al.*, 1979 dengan mengukur inkorporasi dari hipoksantin oleh parasit<sup>(3)</sup>. Metoda ini sangat cepat, sensitif, dan objektif. Metoda lain adalah dengan mengidentifikasi produksi laktat dehidrogenase parasit sebagai indikator pertumbuhan parasit. Metoda ini tidak memerlukan radioisotop dan dapat dipergunakan pada daerah endemik<sup>(4)</sup>. Beberapa *strain* Plasmodium yang dapat dipergunakan untuk pengujian secara *in vitro* disajikan pada Tabel 1.

**Media kultur.** Kultur *Plasmodium falciparum* dibuat menurut metoda Trager dan Jensen, 1976. Kultur terdiri dari sel darah merah dan medium komplit sehingga hematokrit menjadi 2,5%. Kultur ini dibiakkan di dalam cawan Petri yang diletakkan dalam *candle jar*. *Candle jar* beserta isinya diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Medium komplit diganti setiap 24 jam<sup>(5)</sup>.

**Pelarut.** Pelarut yang digunakan adalah etanol, air, atau DMSO (untuk senyawa yang tidak larut di dalam etanol). Senyawa yang diuji dilarutkan di dalam etanol absolut, lalu air steril ditambahkan sampai konsentrasi 1 mg/ml. Senyawa yang larut dalam air dilarutkan terlebih dahulu dengan air steril, kemudian diikuti dengan penambahan etanol dengan konsentrasi yang sama<sup>(6)</sup>.

Berikut ini adalah penjelasan mengenai teknik pengujian antimalaria secara *in vitro*.

**Schizont maturation test.** Pada prinsipnya adalah sebagai berikut: Ke dalam sumur mikro yang terdiri atas 96 sumur, 20 µl suspensi 10% eritrosit dengan parasitemia 1,0% dan DMSO 0,1% dimasukkan ke dalam setiap sumur yang telah berisi medium RPMI dengan 10% serum dan 0,1% DMSO yang mengandung beberapa macam dosis senyawa yang diuji sehingga volume akhir 200 µl setiap sumur. Kemudian, semua sumur yang telah terisi senyawa uji ditambah 20 µl suspensi parasit dengan 10% eritrosit dengan parasitemia 1,0%. Lempeng

sumur selanjutnya dimasukkan ke dalam *candle jar* dan diinkubasi selama 18-24 jam tergantung umur parasit pada awal inkubasi. Metoda ini didasarkan pada bentuk cincin (trofozoit muda) yang setelah 24 jam akan berubah menjadi *preschizon* dan *schizon*. Evaluasi dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi selama 24 atau 48 jam, lempeng sumur mikro dikeluarkan, suspensi bagian atas yang jernih dibuang, suspensi yang pekat dibuat sediaan apus darah, sediaan dikeringkan pada suhu kamar, kemudian diwarnai dengan larutan Giemsa<sup>(2,13)</sup>.

**Metoda up take 3H-hipoksantin.** Metoda yang dikembangkan oleh Desjardins *et al.*, 1979 dengan mengukur inkorporasi dari hipoksantin oleh parasit<sup>(3)</sup>. 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 µl campuran RPMI dan serum yang mengandung isotop sebesar 0,25 µCi. 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 metoda *schizont maturation test* dan *up take 3H-hipoksantin* dianalisis dengan mengukur persentase penghambatan pertumbuhan parasit. Konsentrasi penghambatan 50% (IC<sub>50</sub>) senyawa uji ditetapkan dengan analisis *probit*, berdasarkan hubungan log kadar senyawa uji dengan % penghambatan pertumbuhan parasit<sup>(3)</sup>.

**Metoda pLDH.** Metoda ini dikembangkan oleh Mackler dkk. dengan mengukur kadar laktat dehidrogenase plasmodium (pLDH)<sup>(4)</sup>. pLDH adalah enzim glikolitik yang diekspresikan dengan kadar tinggi pada stadium aseksual parasit malaria.

Tabel 1. Beberapa strain *Plasmodium falciparum* standar.

Nama	Asal negara	Resisten terhadap
Dd <sub>2</sub>	Indochina	Klorokuin, kuinin, pirimetamin, sulfadoksin
W <sub>2</sub>	Indochina	Klorokuin, kuinin, pirimetamin, sulfadoksin
HB <sub>3</sub>	Honduras	Pirimetamin
3D <sub>7</sub>	Afrika Barat	-
D <sub>6</sub>	Sierra Leone	-
D <sub>10</sub>	Papua New Guinea	-
CAMP	Malaysia	Pirimetamin
FCB	Asia	Klorokuin, pirimetamin, sikloguanil
7G <sub>8</sub>	Brazil	Klorokuin, kuinin, sikloguanil
K <sub>1</sub>	Thailand	Klorokuin, pirimetamin

LDH dapat diukur dengan menggunakan substrat 3-asetilpiridin adenin dinukleotida (APAD), yang merupakan analog dari NAD. pLDH dapat digunakan untuk mengukur antigen malaria yang berbeda dan dapat digunakan untuk mendeteksi adanya infeksi dari beberapa spesies Plasmodium<sup>(6)</sup>.

Prinsip pengukurannya adalah sebagai berikut: Sepuluh mikroliter dari tiap kultur dimasukkan ke dalam 96 sumuran yang mengandung 100 µl reagent. Lempeng ini ditempatkan ke dalam pembaca ELISA dan penurunan APAD diikuti secara kinetik pada panjang gelombang 365 nm selama 10 menit (koefisien ekstingsi APADH adalah 366 nm)<sup>(9)</sup>. Pada titik akhir setiap sumuran diberikan 20 µl campuran nitrosoluble tetrazolium dan garam fenasetin etosulfat dengan perbandingan 20:1. Penurunan tetrazolium menjadi garam formazan biru diikuti selama 10 menit pada panjang gelombang 650 nm (K650 nm). Pada akhirnya, terbentuknya formazan biru dievaluasi setelah penambahan 30 µl 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Interpretasi pertumbuhan parasit dilakukan secara evaluasi visual melalui penurunan warna setelah 60 menit inkubasi. Reaksi warna dihentikan dengan penambahan 5% asam asetat. Data melalui metoda pLDH ini dianalisis dengan metoda Log-Logit menggunakan *Softmax™ Software (Molecular Devices)* dengan ekstrapolasi langsung data titrasi ke dalam % penghambatan pertumbuhan (IC<sub>50</sub>)<sup>(7)</sup>.

### TEKNIK PENGUJIAN ANTIMALARIA SECARA IN VIVO

Pengujian secara *in vivo* menggunakan *rodent* sebagai hewan uji. Beberapa spesies Plasmodium yang dapat menginfeksi *rodent* dan sering digunakan untuk pengujian disajikan pada Tabel 2. Untuk penapisan antimalaria banyak digunakan hewan coba mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. Beberapa protokol yang sering digunakan

untuk penapisan senyawa antimalaria adalah sebagai berikut:

**Primary biological assesment.** Metode pengujian ini dikembangkan oleh Peters *et al.*, 1970<sup>(10)</sup>. Prinsip pengujiannya adalah sebagai berikut: Hari ke-0: darah yang diambil dari mencit donor dengan parasitemia 30% dicampur di dalam larutan fisiologis yang mengandung 10<sup>8</sup> *P. berghei* eritrosit per ml. Sebanyak 0,2 ml suspensi ini disuntikkan secara intravena (i.v.) atau intraperitoneal (i.p.) ke dalam kelompok hewan coba. Dalam waktu 2-4 jam setelah infeksi, kelompok uji diberikan obat dengan dosis tunggal secara i.p., subkutan (s.k.), i.v., atau oral. Pada hari ke-1-4, 24, 48 dan 72 jam setelah infeksi, terhadap kelompok uji diberikan lagi senyawa uji dengan dosis dan pemberian yang sama dengan hari ke-0. Hari ke-0,1; 2, 3, dan 4 dilakukan pemeriksaan parasitemia dengan membuat sediaan apus darah tipis, dengan pewarnaan Giemsa. Pemeriksaan % parasitemia dilakukan untuk setiap 1000 eritrosit dan dilakukan selama 4 hari berturut-turut<sup>(8)</sup>. Data yang diperoleh digambarkan dalam hubungan antara % penghambatan parasitemia dan besarnya dosis<sup>(10)</sup>.

**Secondary biological assessment.** Untuk senyawa uji yang memperlihatkan efek yang baik pada *primary 4-day suppressive test* dilakukan uji lanjutan dengan metoda *secondary biological assessment*.

**a) Dose ranging test.** Metode ini digunakan untuk mencari ED<sub>50</sub> dan ED<sub>90</sub> dengan menggunakan 4 tingkatan dosis (3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, dan 100 mg/kg dengan cara pemberian secara s.k. dan oral).

**b) Onset of activity and recrudescence.** Pada metode ini diberikan dosis tunggal 100mg/kg selama 3 hari setelah infeksi secara s.k. Pada kelompok kontrol diberikan pelarut. Setelah 12 jam, 24 jam, dan hari ke-33 dari ujung ekor hewan uji diambil darah untuk pemeriksaan sediaan apus darah setiap hari menggunakan pewarnaan Giemsa.

Tabel 2. Karakteristik beberapa spesies Plasmodium pada *rodent* untuk uji malaria.

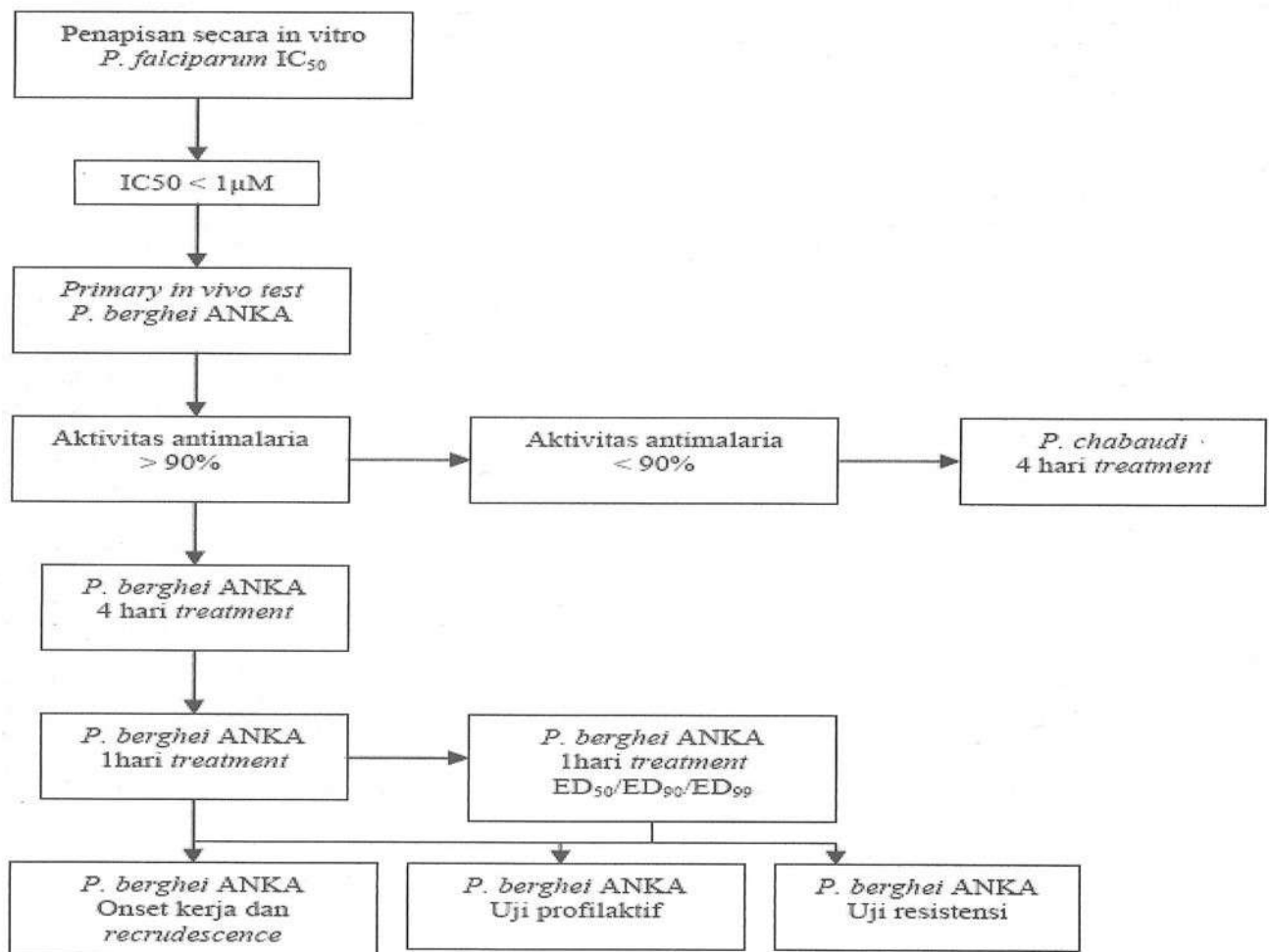
	Spesies Plasmodium			
	<i>P. berghei</i>	<i>P. Yoelii</i>	<i>P. Chabaudi</i>	<i>P. vinckei</i>
Isolasi	1948 (Zaire)	1965 (CAR)	1965 (CAR)	1952 (Zaire)
Siklus	asinkron	asinkron	sinkron	snkron
Periode	22-25 jam	22-25 jam	24 jam	24 jam
Sel host	retikulosit	retikulosit	sel darah	sel darah
Merozoit per schizon	12-18	12-18	6-8	6-12
Penggunaan skrining obat	studi vaksin	mekanisme resistensi	stadium hati	variasi antigen

Keterangan: CAR: Central Africa Republic

c) *Prophylactic test*. Pada uji ini mencit diberikan senyawa uji dengan dosis 100 mg/kg pada 72 jam, 48 jam, 24 jam, dan 0 jam pada waktu infeksi, kemudian dilakukan pemeriksaan parasitemia dengan pemeriksaan sediaan apus darah. Untuk semua uji dapat digunakan klorokuin sebagai kontrol positif ED<sub>50</sub> 1,5-1,8 mg/kg dengan menggunakan *Plasmodium*

*berghei* ANKA pada pemberian s.k. dan oral.

*Tertiary biological assessment*. Metode ini digunakan untuk menguji antimalaria baru dengan target kerja yang sama dengan obat antimalaria yang ada guna mengetahui adanya resistensi silang. Diagram alir penapisan senyawa antimalaria disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir penapisan senyawa antimalaria.

#### PENGEMBANGAN ANTIMALARIA YANG BERASAL DARI TUMBUHAN

Timbulnya resistensi terhadap obat antimalaria seperti klorokuin dan lainnya ikut mendorong gerakan kembali ke alam untuk mencari obat lain dengan mekanisme kerja yang berlainan serta

mengembangkan antigen dan vaksin antimalaria. Upaya untuk menemukan antimalaria baru dari tanaman obat telah dilakukan secara sangat intensif pada beberapa dasawarsa terakhir ini oleh beberapa peneliti di dunia<sup>(1)</sup>.

Semenjak 1947 telah dilakukan penapisan aktivitas antiplasmodium secara *in vivo* terhadap *P.*

*gallinaceum* dalam ayam, serta *P. cathemerium* dan *P. lophurae* dalam bebek, dengan menggunakan lebih dari 600 jenis tanaman dari 126 suku. Dari pengujian tersebut, 33 jenis tanaman memberikan hasil positif. Tanaman yang paling potensial adalah dari suku Amaryllidaceae dan Simarubaceae. Antimalaria burung bukan merupakan indikator antimalaria pada manusia, karena itu pada 1947 tidak ada tindak lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif antimalaria tersebut<sup>(11,12)</sup>.

Beberapa tanaman obat yang telah digunakan oleh masyarakat secara tradisional untuk mengobati malaria di berbagai negara dunia, terutama dari Afrika dan Amerika Selatan, telah menjadi objek penelitian untuk menemukan molekul baru antimalaria. Ekstrak beberapa tanaman obat tersebut terbukti mempunyai aktivitas antiplasmodium yang sangat kuat ( $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ) sehingga potensial untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi fitofarmaka atau bahkan antimalaria modern. Di antara tanaman tersebut bahkan telah berhasil diisolasi senyawa aktifnya, namun tidak semuanya dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi antimalaria baru karena toksisitasnya yang cukup tinggi.

### SIMPULAN

Kemajuan yang telah dicapai dalam metoda pembiakan *P. falciparum* dan metoda pengujian baik secara *in vitro* maupun *in vivo* membawa pula kemajuan dalam penelitian obat-obat antimalaria yang berasal dari tumbuhan.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Mustofa. Molekul antimalaria alami: potensi dan tantangan pengembangannya sebagai obat baru untuk malaria. MOT. 2003.8(26):8-18.
2. Rieckmann KH, Sax LJ, Cam GH, Mrema JE. Drug susceptibility of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. Lancet 1.1978:22-3.
3. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes DE, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother. 1979.(16):710-8.
4. Mackler MT, Hinrichs DJ. Measurement of lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. Am J Trop Med. 1993.(48):205-10.
5. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976.(193):673-5.
6. Dennis E, Kyle H, Webster K. *In vitro* antimalarial drug susceptibility. 2002.
7. Makler MT, Ries JM, Williams JA, et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. Am J Trop Med. 1993. 48(6):739-41.
8. Markell EK, Voge M, John DT. Medical parasitology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1986.
9. Iqbal J, Hira P, Sher A, Al-Eneji A. Diagnosis of imported malaria by Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) and histidine-rich protein-2 (PfHRP-2)-based immunocapture assays. Am J Trop Med. 2001.64(1):20-3
10. Peters W. Techniques for the study of drug response in experimental malaria, chemotherapy and drug resistance in malaria. New York: Academic; 1970.p.64-136.
11. O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC. Plants as sources of antimalarial drugs, part I: *in vitro* test method for the evaluation of crude extract from plants. Plant. Med. 1985.(5):384-397.
12. Phillipson JD. Assays for antimalarial and amoebicidal activities. In: Dey PM, Harborne JB. Methods in plants biochemistry. Vol. 6. Assays for bioactivity. London: Academic Press Harcourt Brace Jovanovich Publisher; 1991.p.135-52.
13. Wernsdorfer WH, Payne D. Drug sensitivity test in malaria parasites. In: Wernsdorfer WH and Mc Gregor. Malaria principles and practice on malariology. Vol. II. London: Churchill; 1988.p.1765-92.