

**ASAM L ASKORBAT MENINGKATKAN AKTIVITAS  
ANTIMALARIA ARTEMISININ BERGANTUNG KONSENTRASI**  
*(L ascorbic acid concentration dependently increases anti malaria  
activity of artemisinin)*

**Susy Tjahjani, Tri Hanggono Achmad, Din Syafruddin, Ridad Agoes,  
Mughtan Sujatno**

## ABSTRAK

Artemisinin, sebagai suatu senyawa endoperoksida siklik (sekuisterpen lakton), mempunyai efikasi antimalaria yang sangat ampuh terhadap Plasmodium yang multi resisten. Mekanisme kerja artemisinin sebagai antimalaria masih belum jelas, tetapi perannya dalam produksi *carbon centered free radical* setelah bereaksi dengan heme telah diketahui. Dengan terjadinya alur permeasi baru pada membran eritrosit yang terparasitasi, diharapkan asam L askorbat sebagai suatu antioksidan yang hidrofilik tidak akan menembus membran tersebut. Oleh karena itu, suplementasi asam askorbat pada pengobatan menggunakan artemisinin perlu dipelajari, apakah asam askorbat tersebut mempengaruhi aktivitas antimalaria obat tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek berbagai konsentrasi asam askorbat terhadap *Plasmodium falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin *in vitro*.

*P. falciparum* strain 3D7 dikultur secara *in vitro* dengan diberi artemisinin  $IC_{50}$  dan berbagai konsentrasi asam askorbat serta diinkubasi selama 24 jam pada *candle jar* dalam inkubator suhu  $37^{\circ}C$ . Eksperimen dilakukan dengan 3 kali replikasi. Hasil eksperimen dianalisis dengan ANOVA dan Tukey HSD.

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa konsentrasi asam askorbat  $4 \mu M$  -  $20 \mu M$  dapat meningkatkan aktivitas artemisinin. Suplementasi asam askorbat dalam konsentrasi  $100$ -  $500 \mu M$  tidak mempengaruhi aktivitas artemisinin sedangkan dalam konsentrasi  $2.500 \mu M$  menurunkan aktivitasnya.

Kata kunci: vitamin C, antimalaria, artemisinin

## ABSTRACT

*Artemisinin, a cyclic endoperoxide compound (sesquiterpene lactone), exhibits antimalarial activity with high efficacy against multi-drug resistant parasite. Its precise mechanism remains unclear but involvement of the production of carbon-centered free radical upon the reaction with heme has been confirmed. Because of new permeation pathway evidence at parasitized red blood cell membrane, L ascorbic acid as hydrophilic antioxidant is expected not to penetrate the membrane. Therefore, supplementation of ascorbic acid in the malaria treatment using artemisinin, need to be studied whether it interferes with the antimalarial activity. The aim of this study is to determine the effect of various concentrations of ascorbic acid against Plasmodium falciparum in vitro in the presence of artemisinin.*

*The P. falciparum, 3D7 strain was propagated in vitro in the presence of  $IC_{50}$  of artemisinin and supplemented with a wide concentration ranges of ascorbic acid and incubated for 24 hours in a candle jar at  $37^{\circ}C$  incubator. The experiment was done in triplicate and the result was examined and analyzed using ANOVA and Tukey HSD.*

*Our results showed that  $4 \mu M$  -  $20 \mu M$  ascorbic acid increased the artemisinin activity. Supplementation with ascorbic acid at concentration  $100$ - $500 \mu M$  did not alter significantly the artemisinin activity where as ascorbic acid at dose  $2.500 \mu M$  did reduce the activity.*

*Keyword: vitamin C, antimalaria, artemisinin*

## **PENDAHULUAN**

Malaria pada manusia merupakan penyakit dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi dan diperkirakan di seluruh dunia terdapat kasus-kasus malaria sebanyak 300 sampai 500 juta per tahun dengan angka kematian mencapai 1,5- 2,7 juta per tahun.<sup>1</sup> Pada masa eradikasi malaria setengah abad yang lalu, malaria berhasil dieliminasi atau ditekan dengan efektif pada banyak bagian di dunia terutama pada daerah subtropik. Sekarang penyakit ini muncul lagi pada daerah yang tadinya sudah bebas malaria. Hal ini terjadi karena adanya resistensi parasitnya terhadap obat malaria.<sup>2</sup>

Sebagai salah satu upaya untuk mengatasi resistensi parasit terhadap obat anti malaria, maka diperkenalkanlah Artemisinin, obat yang sangat berkhasiat terhadap *Plasmodium*, baik *P. falciparum* ataupun *P.vivax*, termasuk yang resisten terhadap obat antimalaria konvensional.<sup>3,4,5</sup> Artemisinin merupakan suatu *free radical generating antimalaria* karena merupakan senyawa endoperoksida siklik (*sesquiterpene endoperoxide*) yang akan mengoksidasi heme membentuk radikal bebas sehingga mencegah polimerisasi heme lebih lanjut menjadi hemozoin yang tidak toksik. Radikal bebas yang terbentuk ini akan merusak membran plasma parasit dan mengganggu enzim parasit sehingga menimbulkan kematian parasit tersebut.<sup>6</sup> Radikal bebas yang terbentuk juga terlibat dalam kalainan patologik jaringan inang, misalnya kerusakan pada permukaan endotel pembuluh darah selama menderita malaria seperti pada malaria serebral<sup>7</sup> dan terjadinya sekuestrasi eritrosit yang terinfeksi oleh stadium aseksual lanjut dalam kapiler dan vena jaringan-jaringan pada berbagai organ yang menyebabkan kerusakan organ tersebut.<sup>8</sup> Selain itu

neuropati toksik yang berupa neurodegenerasi batang otak sebagai akibat pemakaian artemisinin juga dapat disebabkan oleh stres oksidatif serta defisiensi antioksidan.<sup>9</sup>

Untuk mengatasi dampak radikal bebas yang dihasilkan oleh artemisinin terhadap sel inang, diperkenalkan suplementasi asam L askorbat yang dikenal sebagai vitamin C, suatu antioksidan yang larut dalam air. Pada penyakit malaria falciparum yang menyerang anak-anak Nigeria didapatkan penurunan kadar asam askorbat ini serta tingginya kadar lipid peroksida dalam plasma yang bertanggungjawab terhadap kerusakan jaringan pada penderita malaria.<sup>10</sup> Pemberian asam askorbat *in vitro* dapat mengurangi apoptosis sel endotel yang disebabkan malaria.<sup>11</sup> Asam askorbat yang merupakan molekul hidrofilik diharapkan tidak bisa masuk ke dalam sel eritrosit yang terparasitiasi karena pada membran eritrosit yang terparasitiasi terjadi suatu perubahan yang disebut dengan jalur permeasi baru (*new permeation pathway*) yang mengakibatkan molekul yang dapat menembus membran eritrosit terparasitiasi tersebut hanyalah molekul kecil yang hidrofobik saja.<sup>12</sup> Pemberian suplementasi asam askorbat pada terapi malaria menggunakan artemisinin akan sangat bermanfaat bagi inang. Sejauh mana pengaruh suplementasi ini terhadap aktivitas artemisinin sebagai antimalaria masih perlu dipelajari lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauh apa pengaruh asam askorbat terhadap aktivitas antimalaria artemisinin atau adakah interferensi asam askorbat terhadap aktivitas antimalaria artemisinin.

## **BAHAN DAN METODE**

**Bahan:** *P. falciparum* beku strain 3D7 (diperoleh dari Lembaga Eijkman Jakarta), medium RPMI yang berisi eritrosit manusia dan serum manusia yang sudah

diinaktivasi sebagai medium kultur *Plasmodium*, artemisinin pro-analitik (Sigma-Aldrich), asam askorbat pro-analitik

### **Metode:**

*P. falciparum* beku dicairkan kemudian dikultivasi dalam medium kultur yang mengandung eritrosit dengan hematokrit 5 % dan serum manusia 10% serta ditaruh dalam *candle jar* yang kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C. Medium kultur tiap hari diganti sampai mencapai stadium parasit yang sama, dengan tingkat parasitemia 1-2 %. Pelet eritrosit dengan volume yang sama dimasukkan ke dalam masing-masing sumur pada lempeng mikro 4x6 yang berisi medium kultur dengan artemisinin IC<sub>50</sub> dan asam askorbat berbagai konsentrasi, yaitu 0 µM, 4 µM, 20 µM, 100 µM, 500 µM, 2.500 µM sedemikian rupa sehingga volume masing-masing sumur adalah 1 ml. Lempeng mikro kemudian diinkubasi dalam *candle jar* di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, parasitemia pada pelet eritrosit tersebut diperiksa secara mikroskopik dengan pewarnaan Giemsa. Dilakukan penghitungan jumlah eritrosit yang terparasitasi dalam 1000 eritrosit, kemudian jumlah eritrosit terparasitasi ini dijadikan persen per 100 eritrosit. Eksperimen dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil penelitian dianalisis dengan ANOVA dan uji Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

### **HASIL PENELITIAN**

Setelah masa inkubasi berakhir, medium kultur dibuang dan dibuat apus pelet eritrosit hasil inkubasi dengan pewarnaan Giemsa seperti hasil tampak pada Gambar 1 dibawah ini.



**Gambar 1.** Foto apus pelet eritrosit dalam kultur + artemisinin + asam askorbat konsentrasi 20  $\mu\text{M}$  dengan perbesaran 1000 kali. (pRBC : *parasitized red blood cell*)

Hasil parasitemia dalam masing-masing sumur pada lempeng mikro adalah seperti yang terdapat pada **Tabel 1** berikut ini.

	<b>K</b>	<b>KA</b>	<b>C<sub>4</sub></b>	<b>C<sub>20</sub></b>	<b>C<sub>100</sub></b>	<b>C<sub>500</sub></b>	<b>C<sub>2500</sub></b>
	2,101	1,086	0,360	0,286	0,760	1,104	1,243
	1,848	0,558	0,394	0,337	0,558	0,853	0,865
	1,592	0,658	0,276	0,443	0,564	0,653	1,519
Rata-rata	<b>1,847<sup>e</sup></b>	<b>0,767<sup>c</sup></b>	<b>0,343<sup>a</sup></b>	<b>0,355<sup>ab</sup></b>	<b>0,627<sup>abc</sup></b>	<b>0,870<sup>cd</sup></b>	<b>1,209<sup>d</sup></b>
	$\pm 0,255$	$\pm 0,280$	$\pm 0,061$	$\pm 0,080$	$\pm 0,115$	$\pm 0,226$	$\pm 0,328$

Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna ( $p < 0,05$ )

**Tabel 1.** Hasil parasitemia pada lempeng mikro setelah inkubasi 24 jam.

Keterangan:

**K** = kultur *P. falciparum* tanpa artemisinin dan tanpa asam askorbat

**KA** = kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin  $\text{IC}_{50}$  tanpa asam askorbat

**C<sub>4</sub>** = konsentrasi asam askorbat 4  $\mu\text{M}$  dalam kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin  $\text{IC}_{50}$ .

**C<sub>20</sub>** = konsentrasi asam askorbat 20  $\mu\text{M}$  dalam kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin  $\text{IC}_{50}$ .

**C<sub>100</sub>** = konsentrasi asam askorbat 100  $\mu\text{M}$  dalam kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin  $\text{IC}_{50}$ .

**C<sub>500</sub>** = konsentrasi asam askorbat 500  $\mu\text{M}$  dalam kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin  $\text{IC}_{50}$ .

**C<sub>2.500</sub>** = konsentrasi asam askorbat 2500  $\mu\text{M}$  dalam kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin  $\text{IC}_{50}$ .

Sehubungan data persentasi parasitemia dalam kultur *P. falciparum* yang diinkubasi dengan artemisinin IC<sub>50</sub> dan asam askorbat berbagai konsentrasi tersebut di atas semuanya < 20 %, data tersebut sebelum dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan ANOVA, perlu ditransformasi terlebih dahulu dengan transformasi arkus sinus supaya terdapat sebaran data yang normal.

Tampak bahwa parasitemia pada C<sub>100</sub> dan C<sub>500</sub> = KA, parasitemia pada C<sub>4</sub> dan C<sub>20</sub> < KA, sedangkan parasitemia pada C<sub>2.500</sub> > KA. Hal ini berarti bahwa konsentrasi asam askorbat 100 µM dan 500 µM dalam kultur tidak mempengaruhi aktivitas artemisinin sebagai antimalaria; konsentrasi asam askorbat 4 µM dan 20 µM dalam kultur meningkatkan aktivitas tersebut, sedangkan konsentrasi asam askorbat 2.500 µM mengurangi aktivitas obat ini.

## PEMBAHASAN

Fakta yang didapat bahwa asam askorbat konsentrasi rendah dapat menurunkan tingkat parasitemia pada kultur eritrosit dapat disebabkan kemungkinan karena asam askorbat konsentrasi rendah dalam medium kultur tersebut meredam oksidan secara lengkap dan asam askorbat tersebut berubah menjadi *dehydroascorbic acid* (DHA)<sup>13</sup> yang stabil sehingga integritas membran eritrosit lebih kuat dan lebih tahan terhadap stres oksidatif, dengan demikian eritrosit tersebut tidak mudah pecah dan invasi parasit ke dalam eritrosit baru menjadi berkurang. DHA bukan merupakan *uncoupler* sehingga tidak mudah menembus membran eritrosit yang terparasitisi dengan akibat tidak terjadinya *recycle* DHA ini dalam eritrosit yang terparasitisi tersebut,<sup>13, 14</sup> dengan demikian konsentrasi asam askorbat dalam sel eritrosit yang terparasitisi tersebut tidak meningkat. Oleh karena itu dalam eritrosit yang

terparasitisi, tidak terjadi penurunan kadar radikal bebas yang merupakan salah satu mekanisme kerja artemisinin. Jadi di sini asam askorbat bekerja melindungi membran eritrosit di satu pihak dan di lain pihak asam askorbat tersebut tidak mengurangi efek antimalaria artemisinin dalam sel eritrosit yang terparasitisi sehingga hasil akhir keduanya akan meningkatkan efek antimalaria artemisinin. Persentasi parasitemia dalam kultur *P. falciparum* + artemisinin yang mengandung asam askorbat konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  dan 500  $\mu\text{M}$  sama dengan persentasi parasitemia pada kultur yang mengandung artemisinin saja (KA).

Berbeda dengan persentasi parasitemia pada kultur yang diinkubasi dengan artemisinin dan asam askorbat konsentrasi 4  $\mu\text{M}$  dan 20  $\mu\text{M}$ , pada kultur yang diinkubasi dengan artemisinin dan asam askorbat konsentrasi lebih tinggi, yaitu 2.500  $\mu\text{M}$ , didapatkan persentasi parasitemia yang lebih besar secara bermakna dibandingkan dengan persentasi parasitemia pada kultur yang diinkubasi dengan artemisinin dan asam askorbat konsentrasi 0  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , dan 500  $\mu\text{M}$ . Hal ini berarti asam askorbat dengan konsentrasi tinggi tersebut menurunkan efek antimalaria artemisinin. Ada beberapa hal yang dapat menjelaskan hal ini, di antaranya adalah:

- Dalam teori kemiosmotik dikatakan bahwa suatu *uncoupler*, misalnya asam askorbat yang telah mereduksi prooksidan dan menjadi radikal askorbil, akan dengan mudah masuk ke dalam *inner mitochondria membrane*.<sup>13,14</sup> Kemungkinan teori ini juga berlaku bagi asam askorbat konsentrasi tinggi dalam media kultur karena dalam konsentrasi tinggi tersebut, sehubungan dengan melimpahnya asam askorbat, asam askorbat dalam peredaman radikal bebas dalam kultur hanya melepaskan 1 elektron menjadi radikal askorbil yang merupakan *uncoupler*. *Uncoupler* ini bisa masuk menembus membran eritrosit



yang terparasitisi dan radikal askorbil ini kemudian mengalami *recycling* dalam eritrosit tersebut menjadi asam askorbat lagi untuk kemudian masuk ke dalam vakuola makanan parasit sehingga menghambat efek artemisinin, yang juga bekerja dalam vakuola makanan tersebut dengan meredam radikal bebas yang terbentuk sebagai akibat kerja artemisinin sehingga persentasi parasitemia meningkat.

- Kemungkinan dalam konsentrasi asam askorbat yang tinggi, asam askorbat, yang tadinya tidak dapat menembus membran eritrosit yang terparasitisi karena adanya NPP (*new permeation pathway*), bisa masuk eritrosit yang terparasitisi kemudian ke dalam vakuola makanan parasit sehingga menghambat kerja artemisinin sebagai antimalaria dan mengakibatkan meningkatnya persentasi parasitemia.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian di atas adalah: asam askorbat dapat meningkatkan aktivitas antimalaria artemisinin bergantung kepada konsentrasi, yaitu pada konsentrasi 4  $\mu\text{M}$  dan 20  $\mu\text{M}$ . Berdasarkan hasil penelitian di atas, disarankan untuk pemberian suplementasi asam askorbat dalam suatu dosis tertentu pada penderita malaria khususnya yang mendapat terapi dengan artemisinin supaya dampak negatif radikal bebas terhadap sel inang diredam tetapi tanpa mengurangi aktivitas artemisinin. Untuk mengetahui seberapa besar dosis asam askorbat yang perlu diberikan untuk mencapai tujuan tersebut, perlu dilakukan uji *in vivo*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Dirjen Dikti Depdikbud yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Trigg PI, and Kondrachine AV. The current global malaria situation. In: *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, edited by Sherman IW. Washington, DC: Am Soc Microbiol. 1998, p. 11-22.
2. Na-Bangchiang K & Congpuong K. Current Malaria Status and Distribution of Drug Resistance in East and Southeast Asia with Special Focus to Thailand. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007; 211: 99-113.
3. Li, GQ; Guo XB; Fu LC, Jian HX, and Wang XH. Clinical Trials of Artemisinin and Its Derivates in The Treatment of Malaria in China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88 . 1994; Suppl 1: S5-6
4. Ratcliff A, Siswanto H, Kenangalem E, Maristela R, Wuwung RM, Laihad F, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E, Price RN. Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant falciparum and vivax malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison. *Lancet* 2007 Mar 3;369(9563):757-65
5. Phan, Giao T., de Vries, Peter J., Tran, Binh Q., Le, Hung Q., Nguyen, Nam V., Nguyen, Thang V., Heisterkamp, Siem H., Kager, Piet A. Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam. *Tropical Medicine & International Health*. October 2002; 7 (10): 858-864(7)
6. Tonmunpuean S, Parasuk V, and Kokpol S. QSAR Study of Antimalarial Activities and Artemisinin-Heme Binding Properties Obtained from Docking Calculations. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 19. 2000.
7. Postma NA, Mommers EC, Eling WM, Zuidema J. Oxidative Stress in Malaria; Implication for Prevention and Therapy. *Pharm World Sci.* Aug 1996; 18(4):121-9
8. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Gnsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* Feb 2004;34(2):163-89
9. Schmuck G, Roehrdanz E, Hayes RK, & Kahl R. Neurotoxic Mode of Action of Artemisinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, March 2002; 46 (3): 821-827.
10. Egwunyenga AO, Isamah G, and Nmorsi OP. Lipid Peroxidation and Ascorbic Acid Levels in Nigeria Children with Acute Falciparum Malaria. *African Journal of Biotechnology*. October 2004; 3 (10): 560-563.
11. Hemmer CJ, Lehr HA, Westphal K, Unverricht M, Kratzius M, and Reisinger EC. *Plasmodium falciparum* Malaria: Reduction of Endothelial Cell Apoptosis In Vitro. *Infection and Immunity*. March 2005; 76 (3): 1764-1770.
12. Kirk K. Membrane Transport in Malaria-Infected Erythrocyte. *Physiological Reviews*. April 2001; 81 (2): 495-537
13. May JM. Ascorbate Function and Metabolism in The Human Erythrocyte. *Frontiers in Bioscience*. January 1 1998; 3: 1-10.

14. Mayes PA & Botham KM. The Respiratory Chain & Oxidative Phosphorylation. Dalam Murray RK, DK Granner, PA Mayes, & VW Rodwell Harper's Illustrated Biochemistry. Twenty-sixth Edition. Mc Graw Hill. 2003. P 92-101.