

Profil Fenotipik *Plasmodium falciparum* Galur Papua 2300 Akibat Paparan Antimalaria Artemisinin *in Vitro*

Lilik Maslachah,¹ Yoes Prijatna Dachlan,² Chairul A. Nidom,³ Loeki Enggar Fitri⁴

¹Laboratorium Farmasi Veteriner Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, ²Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga,

³Laboratorium Biokimia Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, ⁴Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Abstrak

Resistensi parasit *P. falciparum* dan penurunan efikasi terhadap artemisinin mengakibatkan masalah malaria menjadi semakin kompleks. Hal ini menjadi salah satu permasalahan kesehatan di dunia yang belum dapat diselesaikan sampai saat ini karena belum ada obat baru pengganti artemisinin. Penelitian ini untuk membuktikan bahwa paparan obat antimalaria artemisinin berulang *in vitro* dapat menyebabkan perubahan profil fenotipik *P. falciparum* galur Papua 2300. Waktu penelitian Februari sampai dengan November 2013. Tempat penelitian di Biomedik Universitas Brawijaya Malang dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Desain penelitian *experimental design* dengan *post test only control group design*. Kultur *P. falciparum* galur Papua 2300 dipapar artemisinin berulang dengan dosis IC_{50} . Pengamatan dilakukan terhadap viabilitas dan nilai IC_{50} dengan menggunakan analisis probit. Kelompok kontrol tidak menunjukkan perubahan nilai IC_{50} juga pada kelompok perlakuan PO1. Nilai IC_{50} terjadi peningkatan setelah perlakuan PO2. Paparan artemisinin berulang pada PO2, PO3, dan PO4 menyebabkan waktu viabilitas *P. falciparum* galur Papua 2300 lebih pendek daripada PO1. Viabilitas stabil setelah perlakuan PO3. Simpulan, paparan artemisinin berulang berpengaruh pada perubahan meningkatkan nilai IC_{50} dan waktu viabilitas *P. falciparum* galur Papua 2300. [MKB. 2015;47(1):1-9]

Kata kunci: Artemisinin, fenotipik, *P. falciparum* galur Papua 2300, resistensi

Phenotypic Profile of *Plasmodium falciparum* Papua 2300 Strain Exposed to *in Vitro* Antimalarial Artemisinin

Abstract

The presence of the *P. falciparum* resistance and decreased of efficacy against artemisinin and its derivatives result in increasingly complex malaria issues. Malaria has become one of the currently unresolved world's health problems due to the lack of new artemisinin replacement drugs. This study aimed to provide evidence that the repeated exposure of *in vitro* artemisinin may cause a change in *P. falciparum* Papua 2300 strain phenotypic. This study was conducted during the period of February to November 2013 in Biomedics Brawijaya University and the Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University. A post-test control only experimental design was used. *In vitro* cultures of *P. falciparum* Papua 2300 strain were treated by repeated artemisinin IC_{50} concentration and were observed for their viability and IC_{50} using probit analysis. The control group did not show any changes after IC_{50} value and PO1 treatment. An increase in IC_{50} value was occurred after PO2. Repeated exposures of artemisinin in PO2, PO3, and PO4 had shorter viability periods than PO1. The viability of was stable after PO3 in this group. In conclusion, repeated exposures of artemisinin influence changes in IC_{50} value and viability period of *P. falciparum* Papua 2300 strain. [MKB. 2015;47(1):1-9]

Key words: Artemisinin, phenotypic, *P. falciparum* Papua 2300, resistance

Korespondensi: Dr. Lilik Maslachah, drh, M.Kes, Laboratorium Farmasi Veteriner Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, *mobile* 08563044094, *e-mail*: lilik.maslachah@yahoo.com

Pendahuluan

Penyakit malaria yang sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat (*public health problem*) di lebih dari 106 negara termasuk Indonesia.¹ Walaupun pemerintah telah melakukan berbagai program pelaksanaan dan pemberantasan penyakit malaria sejak tahun 1959 namun sampai saat ini angka kesakitan dan kematian masih tinggi. Peningkatan insidensi malaria yang cepat dan meluas disebabkan oleh peningkatan resistensi parasit terhadap obat antimalaria.

Obat terbaru untuk terapi malaria yang sampai saat ini dipergunakan adalah artemisinin dan derivatnya, obat ini mempunyai efek kerja lebih cepat daripada obat antimalaria yang lain karena mempunyai mekanisme kerja yang lebih kompleks, tetapi telah ada indikasi bahwa parasit *Plasmodium* telah resisten terhadap obat ini.² Hasil klinis sudah ditunjukkan pada dua pasien terinfeksi *P. falciparum* yang telah resisten terhadap artesunate di Cambodia.³ Hasil penelitian yang dilakukan oleh Wongsrichanalai dan Meshnick⁴ pada tahun 2008 menunjukkan penurunan efikasi malaria *falciparum* terhadap kombinasi artesunate-meflokuin di Cambodia.

Terdapat kasus resistensi parasit *Plasmodium falciparum* dan penurunan efikasi terhadap obat antimalaria artemisinin dan derivatnya ini pada level molekular genetik mengakibatkan masalah malaria menjadi semakin bertambah kompleks dan membahayakan. Hal ini menjadi salah satu permasalahan kesehatan di dunia yang belum dapat diselesaikan hingga saat ini oleh karena belum ditemukan obat baru sebagai pengganti artemisinin. Kegagalan terapi malaria dengan obat antimalaria artemisinin dan derivatnya menimbulkan *era untreatable* malaria. Hal ini menimbulkan suatu pemikiran untuk mencari solusi penatalaksanaan terapi pada malaria yang akurat dan efisien dengan cara perkembangan percepatan resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria artemisinin daripada penemuan obat antimalaria baru.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Veiga dkk.⁵ menunjukkan bahwa terdapat perlambatan perkembangan siklus hidup dan induksi ekspresi gen yang merupakan salah satu cara bagi parasit *Plasmodium* untuk dapat membebaskan diri dari pengaruh obat antimalaria. Hasil penelitian Mugittu dkk.⁶ menunjukkan bahwa resistensi artemisinin kombinasi diduga karena ada mutasi pada gen *P. falciparum adenine triphosphatase 6 (pfatpase6)*. Meskipun mekanisme resistensi obat artemisinin belum diketahui secara pasti, tetapi diduga resistensi obat antimalaria terjadi karena ada perubahan pada tataran fenotipik,

proteomik, dan genotipik.

Hasil penelitian artemisinin diharapkan dapat menjelaskan konsep ilmu (pengembangan teori baru) yang mendasari mekanisme resistensi *P. falciparum* galur Papua (2300) resisten klorokuin terhadap obat antimalaria tersebut. Penelitian ini menggunakan pendekatan fenotipik dengan model paparan obat antimalaria artemisinin berulang secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa paparan artemisinin berulang secara *in vitro* dapat menyebabkan perubahan profil fenotipik nilai IC₅₀ dan waktu viabilitas *P. falciparum* galur Papua 2300.

Metode

Penelitian ini memakai *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari sampai dengan November 2013. Penelitian ini dilakukan di Biomedik Universitas Brawijaya Malang serta di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

P. falciparum galur Papua 2300 yang telah disimpan dalam nitrogen cair dilakukan *thawing* dengan metode Rowe. Diambil setiap 1 mL larutan suspensi eritrosit tersebut dan dicampurkan dengan 9 mL medium komplet plus 15% serum manusia golongan O dan dimasukkan ke dalam botol biakan (*cultur flask*) dan diinkubasi di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C 5% CO₂, 5% O₂ dan 90% N₂. Penggantian medium dilakukan setiap 48 jam. Untuk mengetahui pertumbuhan dibuat hapusan darah tipis difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan Giemsa, dihitung tingkat parasitemianya yaitu menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1.000 eritrosit di bawah mikroskop.

Kultur *P. falciparum* galur Papua 2300 yang telah mencapai pertumbuhan >5% dilakukan pemeriksaan kosentrasi hambatan 50% (IC₅₀) paparan I dengan menggunakan *well* 24 secara *duplo*. Tiap sumuran perlakuan dan kontrol berisi 1.350 µL media komplet, Sumuran 1 ditambahkan 150 µL obat dengan kosentrasi 10⁻⁵ M kemudian setelah tercampur diambil sebanyak 150 µL ditambahkan pada sumuran 2 begitu seterusnya dan pada sumuran terakhir yang ke-6 diambil dan dibuang sehingga didapatkan kosentrasi tiap sumuran 1 sampai 6 berturut-turut 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ M. Kemudian ditambahkan 50 eritrosit terinfeksi dari hasil kultur untuk setiap sumuran. Kelompok kontrol hanya berisi media komplet disertai eritrosit terinfeksi dari hasil kultur, kemudian diinkubasi

selama 48 jam. Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur dibuat sediaan darah tipis difiksasi dengan metanol, diwarnai Giemsa 20%, setelah didiamkan selama 15 menit, lalu dicuci dengan air kemudian dikeringkan. Setelah itu, dihitung dulu persentase (%) parasitemianya kemudian dilanjutkan dengan menghitung % hambatan. Untuk mencari hasil % hambatan 50% dengan menggunakan program *statistical product and service solution* (SPSS) analisis probit.

Hasil IC₅₀ paparan I dipergunakan untuk paparan obat pertama kali, selanjutnya dosis paparan obat baru (paparan II, III, dan IV) mempergunakan hasil uji IC₅₀ yang baru pada *Plasmodium* setiap paparan.

Pemaparan obat antimalaria artemisinin secara *in vitro* dilakukan dalam *flask* yang berisi 0,5 mL RBC ditambah 1 mL pelet terinfeksi (hematokrit 15%) lalu ditambahkan medium komplet sampai 10 mL yang mengandung obat antimalaria sesuai dosis IC₅₀ serta diinkubasi di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C 5% CO₂, 5% O₂ dan 90% N₂ selama 48 jam. Untuk melihat pertumbuhan parasit dilakukan dengan dibuat hapusan untuk menghitung parasitemia kembali. Setelah itu, kultur dilakukan pencucian dari obat dengan ditambahkan medium komplet dengan perbandingan 1:4 kemudian disentrifus 200 rpm 5 menit. Supernatan dibuang dan diulang 2 kali, serta ditumbuhkan kembali dan diamati viabilitasnya setiap 48 jam. Setelah mencapai parasitemia lebih dari 5%, perlakuan pemaparan obat artemisinin ini diulang sampai 4 kali dengan menggunakan dosis IC₅₀ baru hasil dari *Plasmodium* yang sudah dipapar obat I dengan IC₅₀ I. Hasil IC₅₀ baru untuk memapar *Plasmodium* yang sudah terpapar obat I yang viabilitas dan parasitemianya sudah mencapai >5%. Dosis IC50 II, IC50 III, dan IC50 IV untuk

pemaparan *Plasmodium* berikutnya dilakukan dengan cara yang sama.

Pemeriksaan viabilitas *P. falciparum* galur Papua 2300 dilakukan dengan cara pengamatan yang dimulai dari hasil pertumbuhan 48 jam pertama *P. falciparum* galur Papua 2300 yang sudah dilakukan pencucian bebas dari obat. Pengamatan dilakukan setiap 48 jam sampai ditemukan bentukan ring atau skizon yang memperlihatkan bahwa *Plasmodium* viabel dan dapat tumbuh kembali. Waktu yang dibutuhkan mulai pertama kali ditumbuhkan sampai viabel dilakukan pencatatan.

Data yang didapatkan pada hasil penelitian ini merupakan data konsentrasi hambatan 50% (IC₅₀). Setiap paparan obat dianalisis dengan analisis probit. Pemeriksaan viabilitas dianalisis secara deskriptif.

Hasil

Hasil penghitungan kelompok kontrol (K), nilai IC₅₀ artemisinin pada *P. falciparum* galur Papua 2300 dengan analisis probit masih tetap di sekitar konsentrasi 10⁻⁸ M yang memberikan persentase hambatan pertumbuhan sekitar 51% (Tabel 1).

Hasil perhitungan nilai IC₅₀ artemisinin yang dipaparkan 1 kali (PO1) pada *P. falciparum* galur Papua 2300 dengan mempergunakan analisis probit mempunyai nilai lebih yang besar yaitu 5x10⁻⁸ M yang menunjukkan peningkatan nilai IC₅₀ bila dibandingkan dengan kelompok K yang tidak pernah dipapar artemisinin. Hasil analisis probit pada kelompok K dan kelompok PO1 menunjukkan bahwa *P. falciparum* galur Papua 2300 tidak menunjukkan perbedaan (Tabel 2)

Pada Tabel 3 hasil perhitungan nilai IC₅₀

Tabel 1 Nilai IC₅₀ Artemisinin Kelompok Kontrol (K) pada *P. falciparum* Galur Papua 2300

Konsentrasi (M)	<i>P. falciparum</i> Galur Papua 2300			
	Parasitemia Rata-rata (%)	Pertumbuhan (%)	Hambatan Pertumbuhan (%)	Nilai IC ₅₀
0	9,8	100	0	
10 ⁻⁵	2,1	21	79	
10 ⁻⁶	2,8	29	71	
10 ⁻⁷	3,4	35	65	10 ⁻⁸
10 ⁻⁸	4,8	49	51	
10 ⁻⁹	6,6	67	33	
10 ⁻¹⁰	7,8	80	20	

Tabel 2 Nilai IC₅₀ Artemisinin yang Dipaparkan 1 Kali (PO1) pada *P. falciparum* Galur Papua 2300

Konsentrasi (M)	<i>P. falciparum</i> Galur Papua 2300			
	Parasitemia Rata-rata (%)	Pertumbuhan (%)	Hambatan. Pertumbuhan (%)	Nilai IC ₅₀
0	9,4	100	0	
10 ⁻⁵	2,7	29	71	
10 ⁻⁶	2,9	30	70	
10 ⁻⁷	3,6	38	62	5x10 ⁻⁸
10 ⁻⁸	5,6	59	41	
10 ⁻⁹	7,1	75	25	
10 ⁻¹⁰	7,5	80	20	

artemisinin yang dipaparkan dua kali (PO2) pada *P. falciparum* galur Papua 2300 dengan menggunakan analisis probit mempunyai nilai lebih besar yaitu 7,5 x10⁻⁷ M yang menunjukkan peningkatan nilai IC₅₀ apabila dibandingkan dengan kelompok K dan kelompok PO1. Hasil perbandingan pengujian dengan menggunakan analisis probit nilai IC₅₀ kelompok PO2 dengan kelompok K dan kelompok PO1 pada *P. falciparum* galur Papua 2300 menunjukkan perbedaan.

Pada Tabel 4 hasil penghitungan nilai IC₅₀ artemisinin yang dipaparkan tiga kali (PO3) pada *P. falciparum* galur Papua 2300 dengan menggunakan analisis probit mempunyai nilai lebih besar yaitu 2,5x10⁻⁵ M yang menunjukkan peningkatan nilai IC₅₀ bila dibandingkan dengan kelompok K, kelompok PO1, dan juga PO2. Hasil perbandingan pengujian dengan menggunakan analisis probit nilai IC₅₀ antara kelompok PO3 dan kelompok K, kelompok PO1 dan PO2 pada

P. falciparum galur Papua 2300 menunjukkan perbedaan.

Pada Tabel 5 hasil nilai IC₅₀ artemisinin yang dipaparkan 4 kali (PO4) pada *P. falciparum* galur Papua 2300 dengan mempergunakan analisis probit mempunyai nilai lebih besar yaitu sekitar 5x10⁻⁴ M yang menunjukkan peningkatan nilai IC₅₀ dibandingkan dengan kelompok kontrol K, kelompok PO1, PO2, dan PO3. Hasil perbandingan pengujian dengan menggunakan analisis probit nilai IC₅₀ antara kelompok PO4 dan kelompok K, kelompok PO1, PO2, dan PO3 pada *P. falciparum* galur Papua 2300 menunjukkan perbedaan.

Pada Tabel 6 tampak viabilitas dan persentase parasitemia *P. falciparum* galur Papua 2300 48 jam setelah dikultur dalam medium tanpa artemisinin (kelompok kontrol) dan kelompok perlakuan paparan konsentrasi IC₅₀ artemisinin. Kelompok K mempunyai waktu yang lebih pendek yaitu 2 hari untuk dapat viabel dibandingkan

Tabel 3 Nilai IC₅₀ Artemisinin yang Dipaparkan 2 Kali (PO2) pada *P. falciparum* Galur Papua 2300

Konsentrasi (M)	<i>P. falciparum</i> Galur Papua 2300			
	Parasitemia Rata-rata (%)	Pertumbuhan (%)	Hambatan Pertumbuhan (%)	Nilai IC ₅₀
0	13,3	100	0	
10 ⁻⁴	-	-	-	
10 ⁻⁵	4,9	37	63	
10 ⁻⁶	5,7	43	57	7,5x10 ⁻⁷
10 ⁻⁷	9,7	73	27	
10 ⁻⁸	11,8	89	11	
10 ⁻⁹	12,4	93	7	
10 ⁻¹⁰	12,8	96	4	

Tabel 4 Nilai IC₅₀ Artemisinin yang Dipaparkan 3 Kali (PO3) pada *P. falciparum* Galur Papua 2300

Konsentrasi (M)	<i>P. falciparum</i> Galur Papua 2300			
	Parasitemia Rata-rata (%)	Pertumbuhan (%)	Hambatan Pertumbuhan (%)	Nilai IC ₅₀
0	11,4	100	0	
10 ⁻⁴	3,8	34	66	
10 ⁻⁵	6,8	59	41	
10 ⁻⁶	8,0	70	30	2,5x10 ⁻⁵
10 ⁻⁷	8,5	75	25	
10 ⁻⁸	10,4	91	9	
10 ⁻⁹	10,6	94	6	
10 ⁻¹⁰	11,1	98	2	

dengan semua kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang PO1, PO2, PO3, dan PO4. Pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang menunjukkan peningkatan parasitemia sesudah viabel. Pada kelompok perlakuan paparan artemisinin PO1 dengan konsentrasi 10⁻⁸ M membutuhkan waktu 12 hari untuk dapat viabel setelah pemaparan artemisinin, tetapi setelah paparan artemisinin berulang diperlukan waktu yang lebih pendek untuk dapat viabel seperti pada kelompok perlakuan PO2 yang telah dipapar artemisinin 2 kali dengan konsentrasi 10⁻⁸ M dan 5,0x10⁻⁸ M, membutuhkan waktu untuk viabel 8 hari. Kelompok perlakuan PO3 yang telah dipaparkan artemisinin 3 kali dengan konsentrasi 10⁻⁸ M, 5,0x10⁻⁸ M, dan 7,5x10⁻⁷ M membutuhkan waktu

untuk viabel 6 hari dan menunjukkan waktu viabilitas yang stabil hari ke-6 setelah paparan artemisinin 3 kali pada kelompok PO3 dan 4 kali dengan konsentrasi 10⁻⁸ M, 5,0x10⁻⁸ M, 7,5x10⁻⁷ M dan 2,5x10⁻⁵ pada kelompok PO4.

Pembahasan

Berdasarkan pada Tabel 1–5 terjadi peningkatan nilai IC₅₀ setelah paparan artemisinin berulang mulai dari PO1, PO2, PO3, dan PO4 apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Nilai IC₅₀ PO4 menunjukkan peningkatan yang paling besar bila dibandingkan dengan kelompok yang lain. Hasil artemisinin yang lebih besar dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* galur

Tabel 5 Nilai IC₅₀ Artemisinin yang dipaparkan 4 kali (PO4) pada *P. falciparum* Galur Papua 2300

Konsentrasi (M)	<i>P. falciparum</i> Galur Papua 2300			
	Parasitemia Rata-rata (%)	Pertumbuhan (%)	Hambatan Pertumbuhan (%)	Nilai IC ₅₀
0	13,6	100	0	
10 ⁻³	6,1	45	55	
10 ⁻⁴	7,7	57	43	
10 ⁻⁵	8,2	60	40	5x10 ⁻⁴
10 ⁻⁶	9,9	73	27	
10 ⁻⁷	12,5	92	8	
10 ⁻⁸	13,1	96	4	
10 ⁻⁹	13,3	98	2	
10 ⁻¹⁰	13,7	100	0	

Tabel 6 Viabilitas *P. falciparum* Galur Papua 2300 48 Jam Setelah Dikultur dalam Medium tanpa Artemisinin pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan IC₅₀ Artemisinin

Konsentrasi (M)/ Kelompok	<i>P. falciparum</i> galur Papua 2300		
	Waktu Viabel (hari)	48 Jam KBO	Setelah Viabel
Kontrol (K)	2	14,0	19,0
PO1 (10 ⁻⁸)	12	2,2	4,5
PO2 (5,0x10 ⁻⁸)	8	3,3	3,5
PO3 (7,5x10 ⁻⁷)	6	6,3	10,0
PO4 (2,5x10 ⁻⁵)	6	5,5	5,8

Papua 2300 yang pernah dipapar artemisinin berulang dan tetap mampu bertahan hidup (viabel).

Nilai IC₅₀ artemisinin pada *P. falciparum* galur Papua 2300 kelompok kontrol masih tetap di sekitar konsentrasi 10⁻⁸ M yang memberikan persentase hambatan pertumbuhan yaitu sekitar 51% (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan nilai IC₅₀ artemisinin pada kelompok kontrol yang tidak pernah terpapar artemisinin, artinya tidak dibutuhkan konsentrasi obat antimalaria artemisinin yang lebih tinggi untuk dapat menghambat 50% pertumbuhan *P. falciparum* galur Papua 2300. Keadaan ini disebabkan pada kelompok kontrol *P. falciparum* galur Papua 2300 yang tidak pernah dipapar obat antimalaria artemisinin tidak ada perubahan baik pada level fenotipik maupun genotipik. Pada level fenotipik tidak terjadi perubahan pada stadium perkembangan maupun morfologi. Pada level genotipik tidak terjadi perubahan genomik *Plasmodium* baik pada transkripsi gen maupun ekspresi gen pada waktu translasi (tidak terjadi perubahan pada level protein).^{7,8}

Hasil penghitungan nilai IC₅₀ artemisinin dengan menggunakan analisis probit pada *P. falciparum* galur 2300 pada kelompok perlakuan PO1 memiliki nilai lebih besar yaitu 5,0x10⁻⁸ M yang memperlihatkan ada peningkatan nilai IC₅₀ dibandingkan dengan kelompok K yang tidak pernah dipapar artemisinin. Setelah dilakukan analisis probit untuk membandingkan antara kelompok K dan kelompok perlakuan PO1 pada *P. falciparum* galur Papua 2300 tidak menunjukkan perbedaan. Hasil ini menunjukkan bahwa untuk dapat menghambat 50% pertumbuhan pada *P. falciparum* galur Papua 2300 yang sudah pernah

terpapar obat antimalaria artemisinin PO1 masih dibutuhkan konsentrasi yang sama dengan kontrol yang tidak pernah terpapar artemisinin yaitu 10⁻⁸ M. Artinya, walaupun pernah dipapar artemisinin satu kali, *P. falciparum* galur Papua 2300 masih sensitif terhadap obat antimalaria artemisinin. Hasil nilai IC₅₀ artemisinin yang berbeda ditunjukkan *P. falciparum* galur Papua 2300 setelah paparan artemisinin PO2.

Hasil ini memperlihatkan bahwa pada *P. falciparum* galur Papua 2300 yang pernah dipapar obat antimalaria artemisinin lebih dari satu kali atau telah mengalami paparan berulang obat antimalaria artemisinin yang mampu bertahan hidup (viabel) dan dapat berkembang dengan normal akan menunjukkan perkembangan ke arah resisten dengan membutuhkan konsentrasi obat antimalaria artemisinin lebih tinggi untuk dapat menghambat 50% pertumbuhannya. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 2-5.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Witkowski dkk.⁹ pada *P. falciparum* galur F32 Tanzania yang dipapar artemisinin selama 3 tahun dengan konsentrasi yang rendah mulai 0,01 µM dan ditingkatkan konsentrasinya sampai dengan 10 µM selama 100 kali paparan. Hasil setelah terseleksi yaitu galur F32-ART. Galur tersebut memperlihatkan bahwa dengan paparan artemisinin konsentrasi yang lebih tinggi 35 µM dan 70 µM selama 96 jam hanya galur F32-ART yang mampu bertahan hidup. Studi yang lain ditunjukkan dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Beez dkk.¹⁰ pada *P. falciparum* galur GC06 dan CH3-61 sebelum dan sesudah seleksi dengan artemisinin dengan peningkatan konsentrasi masing-masing 0-20 nM dan 0 sampai 100 nM, setelah parasit viabel menunjukkan peningkatan nilai IC₅₀ pada galur

setelah terseleksi dengan artemisinin yaitu pada galur GC06 pertama mempunyai nilai IC_{50} dari $3,1\pm 0,1$ nM berubah menjadi $12,5\pm 1,6$ nM dan galur CH3-61 pertama mempunyai nilai IC_{50} dari $28,8\pm 1,3$ nM berubah menjadi $58,3\pm 4,5$ nM.

Penelitian yang dilakukan oleh Tucker dkk.⁸ juga menunjukkan bahwa pada parasit yang sudah resisten membutuhkan konsentrasi obat yang lebih besar untuk menghambat pertumbuhannya bila dibandingkan dengan parasit induknya. Nilai IC_{50} mengalami peningkatan pada parasit yang resisten apabila dibandingkan dengan parasit induk pada artemisinin, yang digambarkan; galur induk W2 mempunyai nilai IC_{50} $1,3\pm 0,71$ ng/mL, galur resisten W2QSH200x2 mempunyai nilai IC_{50} menjadi $4,2\pm 2,2$ ng/mL, galur induk D6 mempunyai nilai IC_{50} $0,92\pm 0,10$ ng/mL, galur resisten D6QSH2400x5 nilai IC_{50} menjadi $8,8\pm 1,0$ ng/mL dan galur induk TM91c235 menunjukkan nilai IC_{50} $2,2\pm 1,8$ ng/mL, dan galur resisten TM91c235AL280x2 nilai IC_{50} menjadi $8,7\pm 5,4$ ng/mL. Keadaan ini berarti parasit yang sudah resisten mempunyai kemampuan untuk bertahan terhadap induksi obat yang lebih tinggi.

Peningkatan nilai IC_{50} menjadi 2–5 kali terjadi juga pada tiga galur parasit yang sudah toleran terhadap *artelinic acid*, perubahan pada nilai IC_{50} ini diikuti juga peningkatan jumlah kopi, ekspresi mRNA, dan ekspresi protein dari gen *pfmdr1*.¹¹ Perubahan peningkatan nilai IC_{50} dapat terjadi sampai 12 kali pada parasit yang sudah terseleksi dengan obat yang diikuti juga dengan amplifikasi pada gen *pfmdr1* setelah mengalami tekanan obat selama 3 bulan.¹²

Penurunan sensitivitas terhadap obat antimalaria secara *in vitro* memiliki hubungan erat dengan risiko peningkatan kegagalan terapi pada semua golongan obat antimalaria,¹³ Bukti penggunaan uji obat antimalaria secara *in vitro* pada resistensi artemisinin yang dilakukan oleh Noedl³ memperlihatkan peningkatan nilai ED_{50} pada pasien yang mengalami kegagalan monoterapi dengan artesunat. Studi longitudinal yang dilakukan oleh *Cambodian National Malaria Control Program* juga menunjukkan peningkatan geometrik nilai IC_{50} artesunat rata-rata pada isolat dari Cambodia bagian barat dibandingkan dengan isolat Cambodia bagian timur yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} mengalami suatu peningkatan yang bermakna dan mengalami kegagalan pada penggunaan terapi kombinasi artesunat-meflokuin.¹⁴ Studi yang dilakukan oleh Huttinger dkk.¹⁵ juga melaporkan peningkatan nilai IC_{50} artesunat dengan perbedaan genetik isolat Cambodia bagian timur dan Thailand diperkirakan menjadi sepuluh kali penurunan

sensitivitas pada artesunat secara *in vitro* yang terjadi setelah periode 10 tahun. Hasil semua studi ini sudah cukup untuk menilai bahwa uji secara *in vitro* dapat dipergunakan untuk memprediksi munculnya resistensi terhadap artemisinin.¹⁵

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Tucker dkk.⁸ pada *Plasmodium* galur induk D6 dengan *Plasmodium* galur yang sudah resisten D6QSH2400x5 morfologi normal setelah paparan obat antimalaria artemisinin membutuhkan waktu yang cepat untuk tumbuh normal kembali dan ratio bentuk morfologi parasit normal dua kali lebih tinggi pada parasit yang sudah resisten bila dibandingkan dengan parasit galur induknya. Keadaan ini menunjukkan bahwa galur parasit yang sudah resisten pada artemisinin mempunyai kemampuan untuk dapat menghasilkan lebih besar parasit *dorman* dan mempunyai kemampuan lebih cepat untuk keluar dari periode *dorman* (viabel) sehingga pada parasit yang sudah resisten pada artemisinin mempunyai kecepatan pemulihan yang lebih tinggi daripada galur induk yang tidak resisten dan akan mempercepat rekudesensinya.

Penelitian yang dilakukan Veiga dkk.⁵ pada paparan obat antimalaria meflokuin dengan dosis IC_{50} pada 3 galur *P. falciparum* yaitu W2, 3D7, dan FCB juga menunjukkan *morphology arrest* pada ketiga galur tersebut dengan gambaran *dorman*. Kuantifikasi RNA parasit yang menyebabkan kemampuan suatu parasit dapat viabel kembali dengan masa pemulihan pertumbuhan 7 sampai 10 hari sesudah bebas dari pemberian obat. Tiap-tiap gen mempunyai profil ekspresi pada tingkat morfologi yang sekali terinduksi oleh obat akan menunjukkan ekspresinya terhadap morfologi sel. Induksi oleh obat antimalaria meflokuin pada keterlambatan morfologi sel ini dapat dideteksi melalui analisis pola transkripsi gen. Keterlambatan siklus perkembangan sel ini sebagai suatu fenomena resistensi obat yang sangat penting dihubungkan dengan penurunan kesempatan obat secara efektif bekerja pada target disebabkan karena efek farmakodinamik obat menurun sehingga tidak efektif secara klinis. Hal ini akan didapatkan pada sel dengan penurunan konsentrasi obat pada kompartemen sel target yang disebabkan aktivitas transporter transmembran melalui penurunan metabolik sel dengan perlambatan pertumbuhan pada siklus sel.⁵

Satu mekanisme *P. falciparum* untuk dapat bertahan digambarkan dengan sifat *dorman* terhadap parasit stadium intraeritositik untuk beristirahat pada perkembangan stadium ring

setelah paparan obat dan membutuhkan waktu beberapa hari sampai minggu untuk tumbuh normal kembali. Mekanisme parasit untuk dapat mencapai *dorman* ini dengan cara menurunkan kecepatan degradasi hemoglobin pada stadium ring. Hal ini efektif untuk menurunkan jumlah produk hemoglobin yaitu ion fero yang dihasilkan dari degradasi hemoglobin yang menurunkan aktifitas dan konversi artemisinin membentuk reaktif intermediet yang mampu meningkatkan aktivitas artemisinin, juga pada stadium *dorman* ini parasit dapat bertahan lebih lama terhadap obat antimalaria. Proses pemulihan dari *dorman* ini juga dapat mempertinggi kekambuhan setelah pengobatan monoterapi dengan artemisinin atau artesunat.¹⁶

Data hasil penelitian menggunakan simulasi model pada manusia dengan pemberian terapi artemisinin selama 1, 3, dan 7 hari menunjukkan bahwa paparan obat antimalaria artemisinin mampu menginduksi periode *dorman* pada *P. falciparum*, akan tetapi semakin lama pemberian terapi, terjadi penurunan persentase parasit *dorman*. Parasit tersebut dapat ditemukan lagi setelah 28 hari meskipun terjadi penurunan pada pemberian yang lebih lama. Pola morfologi *P. falciparum* akibat oleh paparan artemisinin dapat menggambarkan interaksi pada parasit yang terbangun dengan sistem imun *hospes* oleh karena sistem imunitas *hospes* memiliki peran yang sangat penting. Artemisinin juga memiliki kemampuan untuk melepaskan ikatan pfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein1*) dengan reseptor endotel, sedangkan kemampuan yang ditunjukkan oleh parasit untuk tumbuh kembali (*viabel*) dan kegagalan terapi sangat terkait dengan respons antibodi *hospes* terhadap pfEMP1 yaitu suatu famili dari protein yang dihasilkan oleh *var* gen. Selama periode *dorman* anti-pfEMP1 antibodi yang dihasilkan dipicu oleh akibat pengobatan yang diberikan sehingga mampu mengontrol parasitemia yang dapat menyebabkan penurunan jumlah parasit yang *viabel*. Parasit mengubah varian pfEMP1 (*var* gen) terjadi pada fase *viabel* sehingga tidak ada respons imun *hospes* untuk menghasilkan antibodi yang dapat menyebabkan kegagalan terapi pada artemisinin.¹⁷

Hasil penelitian viabilitas *P. falciparum* galur Papua 2300 sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Teuscher dkk.¹⁸ pada *P. falciparum* galur W2, D6, HB3, S55, dan PH1 yang diberi obat antimalaria dihidroartemisinin selama 6 jam, menunjukkan morfologi ring yang abnormal (*dorman*) dan dapat tumbuh kembali normal setelah 4–20 hari, dengan sekitar 0,044% sampai

1,313% parasit mengalami pemulihan kembali untuk tumbuh normal yang bergantung pada konsentrasi obat dan galurnya. Pada pemberian paparan kombinasi dihidroartemisinin dengan meflokuin yang menunjukkan penurunan dan keterlambatan parasit yang mampu *recovery* sepuluh kalinya tetapi parasit masih mampu menjaga metabolisme dasar. Hal ini dikarenakan meflokuin memiliki waktu paruh eliminasi obat yang lebih panjang sehingga kadar obat dalam darah masih mampu untuk mengeliminasi sisa-sisa parasit.

Hasil penelitian ini menjelaskan antara parasit galur induk dan galur yang sudah mengalami resisten terhadap obat antimalaria artemisinin, dengan pendekatan fenotipik, parasit resisten artemisinin jumlahnya lebih tinggi daripada galur induk tersebut. Resistensi terhadap obat anti malaria artemisinin dapat dilakukan dengan cara menginduksikan obat antimalaria artemisinin pada *P. falciparum* secara *in vitro* walaupun membutuhkan waktu yang lama. Kemampuan parasit masuk dalam periode *dorman* ini sebagai mekanisme resistensi yang dapat menyebabkan rekudesensi parasit dan perpanjangan *parasite clearance times* (PCT). Penelitian lebih lanjut masih dibutuhkan dengan memfokuskan pada sekuensing *whole genom*, dan transkripsi gen (*mRNA*) serta data proteomik pada galur induk (*P. falciparum* galur Papua 2300). Galur yang sudah resisten artemisinin pada hasil penelitian ini adalah *P. falciparum* galur Papua 2300 ART(LM).

Simpulan, berdasarkan hasil uji nilai IC₅₀ artemisinin dan viabilitas pada *P. falciparum* galur Papua 2300 memperlihatkan peningkatan nilai IC₅₀ artemisinin yang dipaparkan berulang pada *P. falciparum* galur Papua 2300 *in vitro* dan juga mampu mempercepat waktu viabilitas *P. falciparum* galur Papua 2300 *in vitro* yang pernah terpapar obat berulang. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut gambaran ultrastruktur target obat (*digestive vacoula* dan mitokondria) akibat paparan artemisinin berulang *in vitro* pada *P. falciparum* galur Papua 2300.

Daftar Pustaka

1. WHO. World Malaria Report: (Online Journal) 2009 (diunduh 31 Maret 2012). Tersedia dari: <http://whqlibdocwhoint/publication/2009/978924156390-engpdf>.
2. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC, Cunha CV, Do Rosario V, dkk. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate

- genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) *tctp*, *mdr1* and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(2):480-9.
3. Noedl H. Evidence of artemisinin resistant malaria in Western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008;359(24):2619-20.
 4. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis.* 2008;4(5):716-8.
 5. Veiga MI, Ferreira PE, Schmidt BA, Schmidt BA, Ribacke U, Bjorkman A, dkk. Antimalarial exposure delays *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic cycle and drives drug transporter genes expression. *PlosOne.* 2010;5(8):e12408.
 6. Mugittu K, Genton B, Mshinda H, Beck HP. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania. *Malaria J.* 2006;5:126.
 7. Teuscher F, Chen N, Kyle DE, Gatton ML, Cheng Q. Phenotypic changes in artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* line *in vitro*: evidence for decreased sensitivity to dormancy and growth inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):428-31.
 8. Tucker MS, Mutka T, Sparks K, Patel J, Kyle DE. Phenotypic and genotypic analysis of *in vitro* selected artemisinin resistant progeny of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):302-14.
 9. Witkowski B, Lelievre J, Barragan MJL, Laurent V, Su X, Berry A, dkk. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1872-7.
 10. Beez D, Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Genetic predisposition favors the acquisition of stable artemisinin resistance in malaria parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):50-5.
 11. Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE. Role of *pfmdr1* amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2455-64.
 12. Chen N, Chavchich M, Peters JM, Kyle DE, Gatton ML, Cheng Q. Deamplification of *pfmdr1*-containing amplicon on chromosome 5 in *Plasmodium falciparum* is associated with reduced resistance to artemisinin *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:3395-401.
 13. Picot S, Olliaro P, de Monbrison FA. Systematic review and meta analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malaria J.* 2009;8:89.
 14. Lim P, Wongsrichanalai C, Chim P. Decreased *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to artesunate, mefloquine, chloroquine and quinine in Cambodia from 2001 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2135-42.
 15. Huttinger F, Satimai W, Wernsdorfer G. Sensitivity to artemisinin, mefloquine and quinine of *Plasmodium falciparum* in northwestern Thailand. *Wien Klin Wochenschr.* 2010;122:52-6.
 16. O'Brien C, Henrich PP, Passi N, Fidock DA. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24 (6):570-7.
 17. Codd A, Teuscher F, Kyle DE, Cheng Q, Gatton ML. Artemisinin induced parasite dormancy: a plausible mechanism for treatment failure. *Malaria J.* 2011;10(56):1-6.
 18. Teuscher F, Gatton ML, Chen N, Peters J, Kyle DE, Cheng Q. Artemisinin induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure. *J Infect Dis.* 2010;202(9):1362-8.