

PENGARUH EKSTRAK BIJI NIMBA (*Azadirachta indica*) TERHADAP PENURUNAN DERAJAT PARASIT DAN JUMLAH HEMOZOIN PADA KULTUR *Plasmodium falciparum*

(THE EFFECT OF NEEM SEEDS EXTRACT (*Azadirachta indica*) ON THE DECREASING OF PARASITE LEVEL AND HEMOZOIN AMOUNT IN CULTURE OF *Plasmodium falciparum*)

Noer Aini^{*}, Soebaktiningsih^{**}, Loeki Enggar Fitri^{**}, Umi Kalsum^{***}, Sumarno^{****}

^{*}Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik Universitas Brawijaya Malang

^{**}Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

^{***}Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

^{****}Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

*Malaria infection is still one of world health's problems that cause a high death rate (20.9% - 50%). One of the reason is Plasmodium falciparum resist to conventional anti-malarial drugs. Neem seeds extract had been reported has antimalarial effect by decreasing parasitemia, but there has not been any report on its effect in inhibition hemazoin formation. The aim of this research was to find the effect of Neem seeds extract on parasitemia and hemazoin level in Plasmodium falciparum culture. Laboratory experiment was done by using Papua isolate of Plasmodium falciparum (2300) from NAMRU 2 Jakarta. After synchronized, malarial culture was divided into 4 groups namely Control group (culture medium only), Chloroquine group, Artemisinin group, and Neem seeds extracts group. Each treatment group was devided into 5 drug doses of 6.25 μ ml, 12.5 μ ml, 25 μ ml, 50 μ ml and 100 μ ml respectively. Parasitemia was measured by Pyridine-hemochrome methods using spectrophotometer λ 560 nm. Statistical analysis was done involving one-way-ANOVA followed by Tukey HSD and Pearson's Correlation. A significant difference was found between control and treatment groups in parasitemia and hemazoin level. Different dose in treatment groups didn't show any significant difference in both parasitemia ($p=0.99$) and hemazoin level ($p=0.985$). Tukey test between treatment groups didn't show a significant difference decrease of hemazoin level and parasitemia ($r=0.970$). The conclusion was Neem deeds extract can inhibit *P. falciparum* growth by decreasing parasitemia and hemazoin level.*

Key words: Neem seeds extract, parasitemia, hemazoin level, *P. falciparum*

PENDAHULUAN

Selama satu abad pemberantasan penyakit malaria, parasit penyebab malaria belum dapat dieliminasi secara total. Perhitungan secara kasar menunjukkan bahwa 120 juta orang menderita malaria dan 1 - 3 juta diantaranya meninggal (1). Di Indonesia hampir semua propinsi mempunyai daerah endemis malaria, walaupun tingkat endemitasnya berbeda-beda. Daerah fokus malaria terbanyak berada di luar Jawa-Bali terutama di Indonesia Bagian Timur, sedangkan fokus di Jawa yaitu di Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan sepanjang pantai selatan di Jawa Barat (2). Berbagai upaya pemberantasan malaria telah dilakukan tetapi prevalensinya masih tetap tinggi. Hal ini disebabkan adanya berbagai hambatan dalam pemberantasan malaria diantaranya resistensi vektor terhadap insektisida dan *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) menghasilkan galur baru yang resisten terhadap pengobatan konvensional (3).

Nimba (*Azadirachta indica*) merupakan tanaman asli Indonesia, dikenal sebagai tanaman obat yang mempunyai aktivitas biologi spektrum luas. Penelitian tentang zat aktif yang

terdapat dalam Nimba mulai dilakukan sejak tahun 1942 oleh Siddiqui yang berhasil mengisolasi Nimbin dari minyak Nimba, kemudian lebih dari 135 komponen telah berhasil diisolasi dari berbagai bagian Nimba dan beberapa diantaranya sudah diketahui struktur kimianya. Komponen utama Nimba terdiri dari isoprenoid dan nonisoprenoid (4). Selama ini bagian Nimba yang banyak diteliti adalah daunnya, padahal pada biji Nimba juga terdapat beberapa zat aktif yang mempunyai aktivitas antimalaria (5). Ekstrak kasar biji Nimba dilaporkan efektif terhadap parasit malaria yang sensitif dan resisten *Chloroquine* (6,7).

Penelitian lain menyatakan ekstrak dan purifikasi fraksi biji Nimba dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan stadium seksual dan aseksual *P.falciparum* yang sensitif dan resisten *Chloroquine* (8). Sampai saat ini penelitian tentang mekanisme kerja ekstrak biji Nimba dalam menurunkan parasit masih belum diketahui secara pasti, pada penelitian *in vivo* diduga berkaitan dengan respon imun.

Hemazoin adalah pigmen malaria yang terbentuk dari proses detoksifikasi heme. Proses detoksifikasi ini dilakukan *Plasmodium* setelah menyerap haemoglobin yang terdapat di eritrosit inang. Selama siklus intraerithrositik, *P.falciparum* menyerap 25 – 75 % Hb yang selanjutnya didegradasi didalam food vacuole *Plasmodium* (pH 4,5 – 5,5) oleh protease spesifik dan asam amino yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai sintesa protein. Selama degradasi Hb akan dikeluarkan free heme yang bersifat sitotoksik bagi *Plasmodium* dan akan

menyebabkan kerusakan membran *Plasmodium* (9). Pada *P.falciparum* salah satu cara detoksifikasi *heme* dicapai dengan cara polimerisasi *free heme* menjadi bentuk kristal yang *insoluble* yang dikenal sebagai *hemozoin* (pigmen malaria).

Hemozoin saat ini menjadi fokus penelitian obat anti malaria, karena mekanisme obat antimalaria yang selama ini bekerja dengan cara menghancurkan sintesa *nucleoprotein* melalui ikatan dengan DNA dan menghambat metabolisme folat mengalami resistensi terutama terhadap *P.falciparum* (10,11). Obat anti malaria yang telah diketahui salah satu mekanisme kerjanya menghambat *hemozoin* adalah *Chloroquine* dan *Artemisinin* (3,12). Nimba diketahui satu golongan dengan *Artemisinin*, yaitu Terpenoid, meskipun demikian selama ini belum ada penelitian ekstrak biji Nimba dalam menurunkan derajat parasit yang dihubungkan dengan penghambatan pembentukan *hemozoin* pada kultur *P.falciparum*.

Berdasarkan uraian diatas maka dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak biji Nimba pada kultur *P.falciparum* dengan melihat pengaruhnya terhadap penurunan derajat parasit dan jumlah *hemozoin*.

METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi dan laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September 2003 – November 2004 dengan menggunakan *P.falciparum* isolat Papua (2300) dan biji Nimba yang diperoleh dari PAU ITB.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan desain *pre test* dan *post test* untuk perhitungan parasit dan *hemozoin* dibandingkan dengan kontrol.

Setelah parasit $\geq 5\%$ kultur malaria dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (hanya mengandung medium kultur dan pada perhitungan *hemozoin* diberi *hemin chloride*) kelompok *Chloroquine*, kelompok *Artemisinin* dan kelompok ekstrak biji Nimba yang masing-masing diberi 5 macam dosis (13). Setelah 48 jam parasit dihitung kembali dari sediaan hapusan darah tipis yang telah dipulas dengan pewarnaan giemsa. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop perbesaran 1000x. *Hemozoin* diukur dengan *sphectrophotometer* dengan panjang gelombang 560 nm, selanjutnya akan dianalisis dengan uji statistika

Ekstraksi dan Evaporasi biji Nimba (14)

Biji nimba sejumlah 600 g dikeringkan kemudian dibersihkan, diblender sehingga diperoleh bentuk bubuk. Bubuk biji nimba ditimbang dengan neraca analitik, dan diperoleh hasil 300 g. Kemudian diekstraksi dengan pelarut *petroleum eter* (b.p 40 -60° C). Ekstraksi dilakukan berulang-ulang sampai warna larutan ekstrak jernih homogen. Ampas dari hasil ekstraksi direndam dengan CH₂Cl₂ (b.p 39,5° – 40,52° C). Kemudian dilakukan ekstraksi kembali seperti pada *petroleum eter* dengan menggunakan CH₂Cl₂ sebagai pelarutnya. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan, hasil yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak kasar *dioven* dan diperoleh hasil akhir ekstrak biji nimba dengan pelarut *petroleum eter* sebanyak 2,4813 g berupa cairan berwarna kekuningan dengan konsistensi seperti minyak.

Thawing dan kultur isolat *P.falciparum* galur Papua (2300) (15)

Isolat parasit diambil dari *liquid Nitrogen Tank*. Ditambahkan NaCl 12 %, 1/5 volume tetes demi tetes dengan *sput*, ditunggu 5 menit. Kemudian ditambahkan NaCl 1,6 % 9 kali volume tetes demi tetes dengan *sput*, ditunggu 5 menit. Di *centrifuge* selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang, pellet ditambahkan 0,9 % NaCl, 0,2 % glucosa, 9 kali volume, tetes demi tetes dengan *sput*, ditunggu 5 menit. Di *centrifuge* kembali selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang, ditambahkan medium RPMI yang mengandung 10 % serum manusia type O dan 5 % hematokrit dan dikultur dalam incubator CO₂.

Sinkronisasi Parasit (16)

Digunakan larutan *Sorbitol Great Culture* 5 %. Suspensi eritrosit dimasukkan tabung *centrifuge*, dicentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit dalam 4 ° C. Supernatan dibuang, *packed cell* ditambah dengan larutan sorbitol 5 kali volume, ditunggu 5 – 10 menit pada temperatur kamar. Dicentrifuge kembali dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 ° C. Supernatan dibuang, dicuci dengan medium lengkap ditambahkan 10 % serum manusia 3 – 4 kali volume, diulangi 2 – 3 kali. *Packed cell* disuspensi dengan medium RPMI yang mengandung 10% serum manusia dan ditambahkan 50% eritrosit segar dan dibuat hematokrit 10 %. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ medium diganti setiap 24 jam.

Tes obat in vitro

Digunakan kultur pada stadium cincin dengan konsentrasi parasitemia $\geq 5\%$. Kultur dipindahkan kedalam RPMI segar (10% serum) sebelum penambahan obat. Ditambahkan *Artemisinin*, *Chloroquine* dan ekstrak biji Nimba dengan konsentrasi masing-masing 6,25 µg/ ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, dan 100µg/ml, dicampur dengan cara inversi kemudian kultur dibagi kedalam wells. Selanjutnya kultur diamati sampai matur (48 jam).

Perhitungan *hemozoin* (17)

Kultur dipindahkan dari well 24 pada tabung *centrifuge* dan disentrifugasi. Ditambahkan Triton X – 100 sampai konsentrasiannya 1 % (4 ml dari 2 % Triton X-100 untuk 4 ml kultur). Disisakan sedikit dari volume kultur untuk pewarnaan Giemsa 5% dan dihitung parasitemianya. Disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 45 menit (Beckman JA-20 rotor) pada suhu 4° C. Supernatant dibuang dan pellet disimpan. Pellet disuspensi kembali dengan 1 ml air distilasi dan dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* sebanyak 1,5 ml. Disentrifugasi lagi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit dalam *microcentrifuge*, pada suhu 4° C. Supernatant dibuang dan pellet disimpan. Membuat kurva standar, hemin diwakili dengan menggunakan *ferriprotochlorophyll IX chloride* (Sigma). Membuat larutan standar dengan cara mencampur larutan cadangan hemin pada DSMO dengan air distilasi. Diambil 520µl dari larutan hemin standard dan dicampur dengan pellet *hemozoin*. Tube yang berisi kultur + pellet *hemozoin* ditambah 520µl air distilasi + 62µl NaOH dan 123µl pyridine (untuk 4 ml sample). Setengah dari volume tersebut digunakan untuk sample. Tambahkan volume yang sama untuk larutan hemin standar. Campuran

larutan tersebut dibagi sama banyak dalam 2 tube microsentrifuge. Ditambahkan 20 μ l dari 2,5 mM Potassium Ferricyanide (K3Fe(CN)6) untuk satu tube haem oxida. Ditambahkan sedikit Sodium Hydrosulfite pada tube yang lain untuk reduksi haem. Dicampur dengan cara inversi. Selanjutnya diukur absorbance dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 560 nm. Dihitung jumlah hemozoin dengan standart hemin: OD560 = OD560 (reduce sample) - OD560 (oxidized sample). Dibandingkan antara hasil hemozoin kontrol, hemozoin

Artemisinin, hemozoin Choloroquine dan hemozoin ekstrak biji Nimba.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan uji beda Anova antara rata-rata derajat parasit dengan jumlah hemozoin terhadap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui signifikan perbedaan tiap-tiap kelompok perlakuan dilakukan uji Tukey pada taraf 5 %. Hubungan antara masing-masing variabel terikat diuji dengan uji korelasi Pearson.

HASIL DAN ANALISIS DATA

Tabel 1. Penurunan derajat Parasit pada Kontrol dan Kelompok Perlakuan

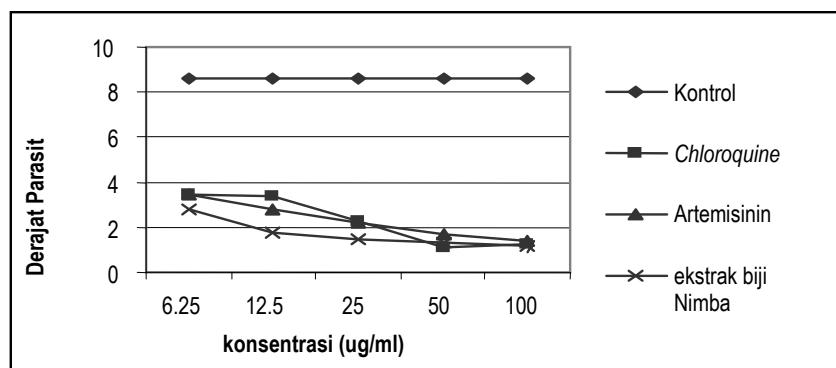
Konsentrasi (μ g/ml)	Parasit % (rata-rata \pm S D)				Analisis Data
	Kontrol	Chloroquine	Artemisinin	Ekstrak biji Nimba	
6,25		3,49 \pm 0,170	3,48 \pm 0,257	2,81 \pm 0,214	* UjiAnova
12,5		3,39 \pm 0,227	2,87 \pm 0,228	1,73 \pm 0,290	p \leq 0,05
25	8,59	2,29 \pm 0,135	2,22 \pm 0,205	1,46 \pm 0,118	
50	\pm 0,758	1,31 \pm 0,144	1,71 \pm 0,312	1,34 \pm 0,067	**UjiTukey
100		1,23 \pm 0,095	1,40 \pm 0,145	1,21 \pm 0,070	p \geq 0,05

Keterangan:

*Uji Anova: terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol dan kelompok perlakuan terhadap penurunan derajat parasit ($p = 0.0001$).

Pemberian konsentrasi yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap penurunan derajat parasit ($p = 0.99$)

** Uji Tukey: diantara kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap penurunan derajat parasit.

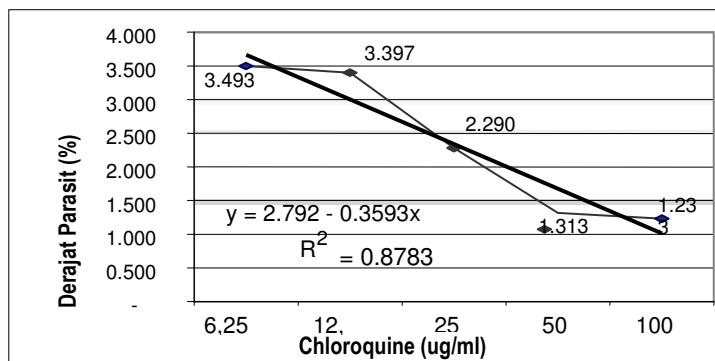


Gambar 1. Kurva penurunan derajat parasit pada kontrol dan kelompok perlakuan.
Tampak penurunan derajat parasit yang signifikan pada kelompok perlakuan.

Dari uji Tukey diperoleh hasil adanya perbedaan signifikan ($p = 0,000$) antara kontrol dengan kelompok perlakuan terhadap penurunan derajat parasit. Sedangkan perlakuan pemberian obat yang berbeda tidak memberikan hasil perbedaan yang signifikan terhadap penurunan derajat parasit dengan nilai $p = 0,998$ untuk

Chloroquine dan Artemisinin, $p= 0,883$ untuk Chloroquine dan ekstrak biji Nimba, dan $p = 0,945$ untuk Artemisinin dan ekstrak biji Nimba.

Analisis Regresi Parasit.

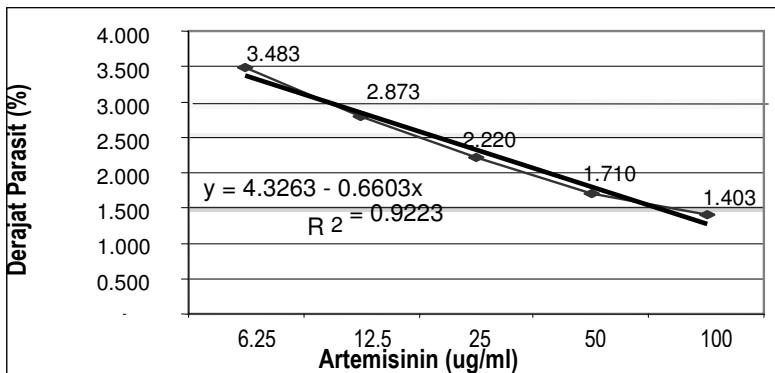


Gambar 2. Kurva regresi *Chloroquine* dengan derajat parasit.

Tampak hubungan terbalik antara peningkatan konsentrasi *Chloroquine* dengan penurunan derajat parasit.

Pada uji regresi diperoleh hasil penurunan derajat parasit yang signifikan ($p = 0,000$) dengan nilai $R^2 = 87,83\%$ dan didapatkan persamaan parasit = $2,792 - 0,3593 X$, ini berarti

bahwa setiap peningkatan konsentrasi *Chloroquine* sebesar 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ akan menurunkan derajat parasit sebesar 0,3593 kali.

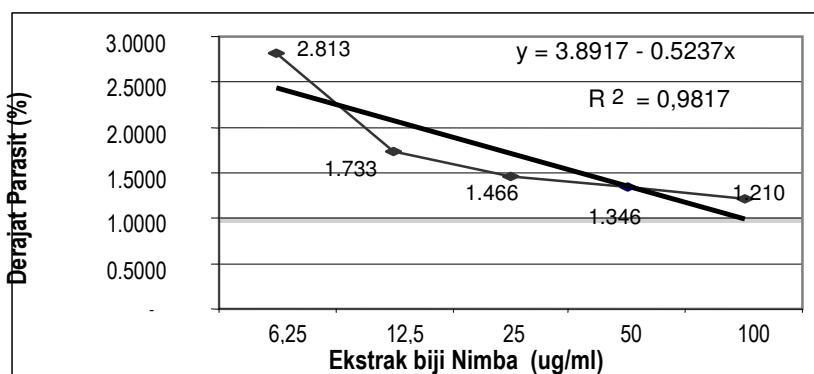


Gambar 3. Kurva regresi Artemisinin dengan derajat parasit.

Tampak hubungan terbalik antara peningkatan konsentrasi Artemisinin dengan penurunan parasit.

Pada uji regresi diperoleh hasil penurunan derajat parasit yang signifikan ($p = 0,000$) dengan nilai $R^2 = 92,23\%$ dan didapatkan persamaan parasit = $4,3263 - 0,6603 X$, Ini berarti

bahwa setiap peningkatan konsentrasi Artemisinin sebesar 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ akan menurunkan derajat parasit sebesar 0,6603 kali.



Gambar 4. Kurva regresi ekstrak biji Nimba dengan derajat parasit.

Tampak hubungan terbalik antara peningkatan konsentrasi ekstrak biji Nimba dengan penurunan derajat parasit.

Pada uji regresi diperoleh hasil penurunan parasit yang signifikan ($p = 0,000$) dengan nilai $R^2 = 98,17\%$ dan didapatkan persamaan parasit = $3,8917 - 0,5237 X$ ini berarti bahwa setiap

peningkatan konsentrasi ekstrak biji Nimba sebesar 1 $\mu\text{g/ml}$ akan menurunkan parasit sebesar 0,5237 kali.

Hemozoin

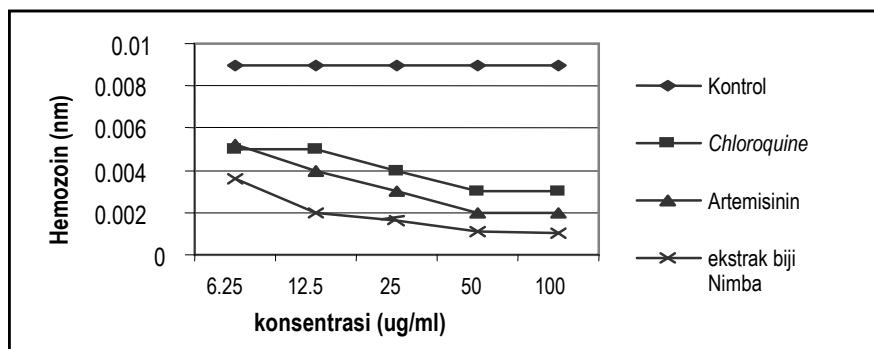
Tabel 2. Penurunan hemozoin pada Kontrol dan kelompok Perlakuan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Kontrol	Hemozoin (nm) (rata-rata \pm S D)			Analisis Data
		Chloroquine	Artemisinin	Ekstrak biji Nimba	
6,25		0,0050 \pm 0,0010	0,0052 \pm 0,00171	0,0036 \pm 0,00076	* Uji Anova $p \leq 0,05$
12,5		0,0050 \pm 0,0011	0,0040 \pm 0,00100	0,0020 \pm 0,00011	
25	0,0090 \pm 0,0010	0,0040 \pm 0,0002	0,0030 \pm 0,00050	0,0016 \pm 0,00115	** Uji Tukey $p \geq 0,05$
50		0,0030 \pm 0,0010	0,0022 \pm 0,00034	0,0011 \pm 0,00028	
100		0,0030 \pm 0,0005	0,0020 \pm 0,00050	0,0010 \pm 0,00011	

Keterangan:

*Uji Anova: terdapat perbedaan signifikan antara kontrol dan kelompok perlakuan terhadap jumlah hemozoin ($p=0,000$). Pemberian konsentrasi yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah hemozoin ($p=0,98$)

** Uji Tukey: diantara kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah hemozoin.

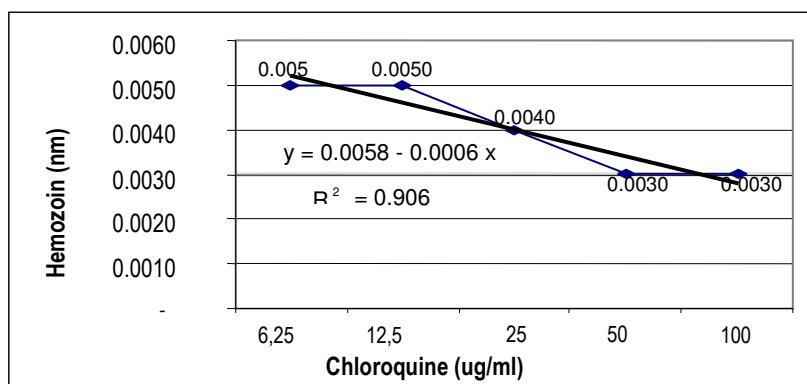


Gambar 5. Kurva jumlah hemozoin pada Kontrol dan kelompok Perlakuan.
Tampak penurunan hemozoin yang signifikan pada KelompokPerlakuan

Dari uji Tukey diperoleh hasil adanya perbedaan signifikan antara kontrol dengan kelompok perlakuan dengan nilai $p = 0,004$ untuk kontrol dengan Chloroquine, $p= 0,001$ untuk kontrol dengan Artemisinin, $p = 0,000$ untuk kontrol dengan ekstrak biji Nimba. Sedangkan perlakuan pemberian obat yang berbeda tidak

memberikan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah hemozoin dengan nilai $p = 0,912$ untuk Chloroquine dan Artemisinin, $p= 0,395$ untuk Chloroquine dan ekstrak biji Nimba, $p = 0,762$ untuk Artemisinin dan ekstrak biji Nimba.

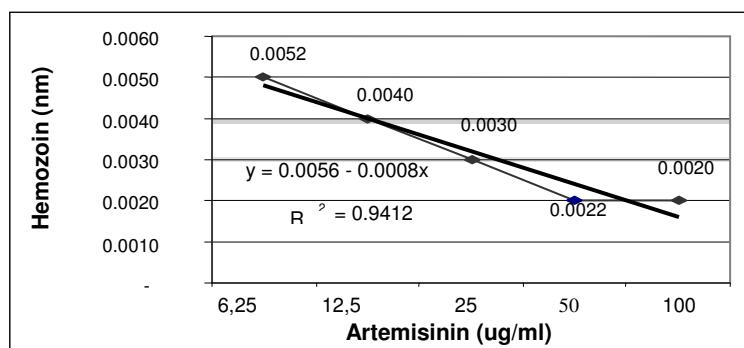
Analisis Regresi Hemozoin



Gambar 6. Kurva regresi Chloroquine dengan hemozoin.
Tampak hubungan terbalik antara peningkatan konsentrasi Chloroquine dengan penurunan hemozoin

Pada uji regresi diperoleh hasil penurunan *hemozoin* yang signifikan ($p = 0,000$) dengan nilai $R^2 = 90,6\%$ dan didapatkan persamaan $\text{hemozoin} = 0,0058 - 0,0006 X$ ini berarti bahwa

setiap peningkatan konsentrasi *Chloroquine* sebesar 1 $\mu\text{g/ml}$ akan menurunkan *hemozoin* sebesar 0,0006 kali.

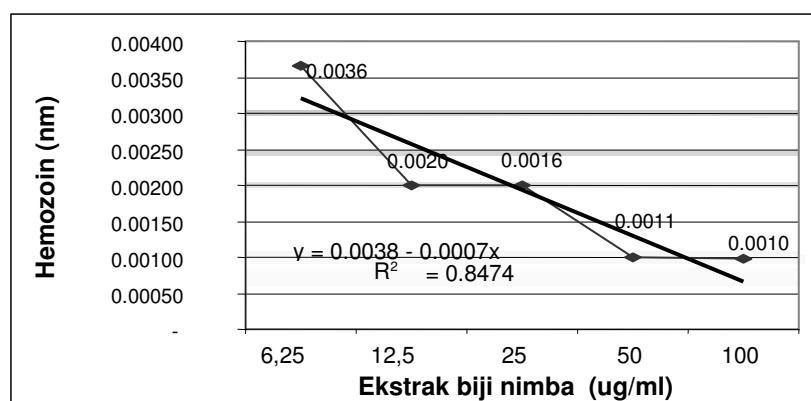


Gambar 7. Kurva regresi Artemisinin dengan *hemozoin*.

Tampak hubungan terbalik antara peningkatan konsentrasi Artemisinin dengan penurunan *hemozoin*.

Pada uji regresi diperoleh hasil penurunan *hemozoin* yang signifikan ($p = 0,000$) dengan nilai $R^2 = 94,12\%$ dan didapatkan persamaan $\text{hemozoin} = 0,0056 - 0,0008X$ ini berarti bahwa setiap

peningkatan konsentrasi Artemisinin sebesar 1 $\mu\text{g/ml}$ akan menurunkan *hemozoin* sebesar 0,0008 kali.



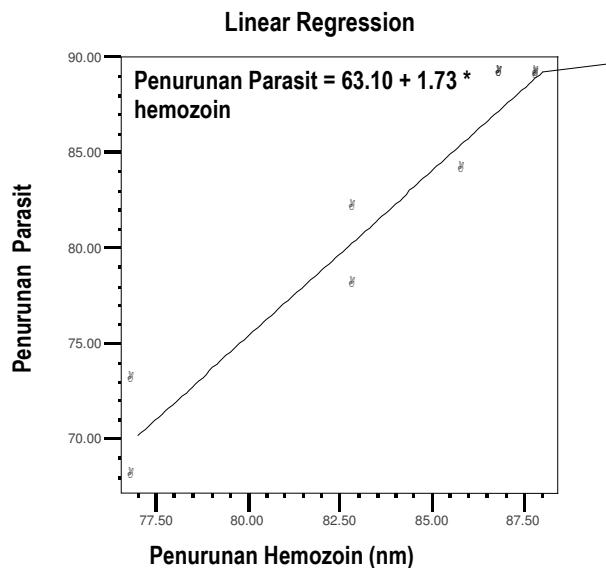
Gambar 8. Kurva regresi ekstrak biji Nimba dengan *hemozoin*.

Tampak hubungan terbalik antara peningkatan konsentrasi Ekstrak biji Nimba dengan penurunan *hemozoin*.

Pada uji regresi diperoleh hasil penurunan *hemozoin* yang signifikan ($p = 0,000$) dengan nilai $R^2 = 84,74\%$, dan didapatkan persamaan $\text{hemozoin} = 0,0038 - 0,0007 X$, ini berarti bahwa setiap peningkatan konsentrasi ekstrak biji Nimba sebesar 1 $\mu\text{g/ml}$ akan menurunkan *hemozoin* sebesar 0,0007 kali.

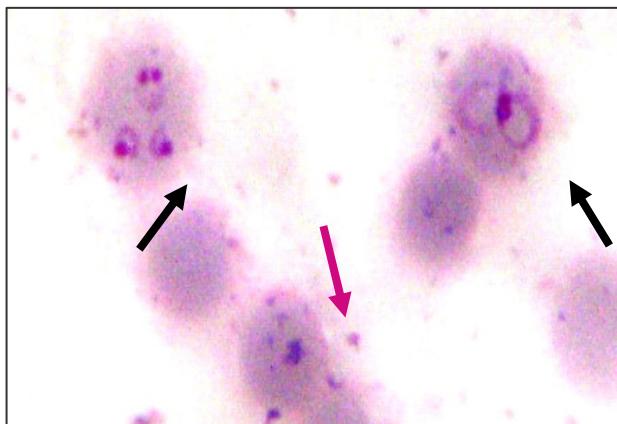
Uji Korelasi Pearson

Untuk mengetahui adanya hubungan antara penurunan jumlah *hemozoin* dengan penurunan derajat parasit pada kelompok perlakuan dilakukan uji Korelasi Pearson.



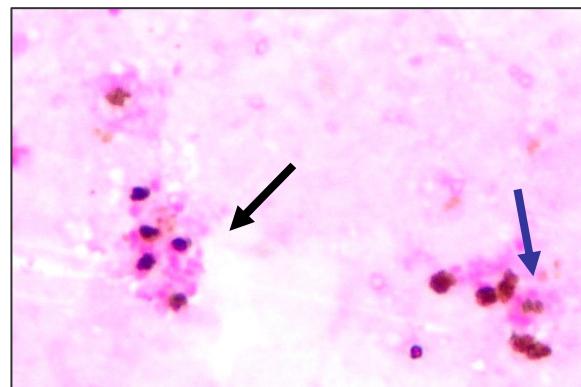
Gambar 9. Scatter plot yang menunjukkan hubungan antara penurunan jumlah Hemozoin dengan penurunan derajat Parasit.

Pada analisis korelasi Pearson didapatkan korelasi positif yang kuat dan signifikan ($r = 0,84$, $p = 0,000$) dan pada analisis regresi didapatkan persamaan penurunan parasit = $63,10 + 1,73$ hemozoin dengan nilai $R = 0,94$. Ini berarti setiap penurunan hemozoin 1 nm akan menurunkan parasit sebesar 1,73 kali.



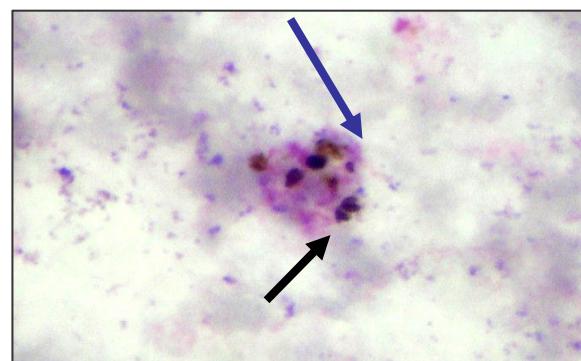
Gambar 10. Proses thawing pada kultur *P.falciparum* (ring form dan schizont)

Panah hitam : eritrosit terinfeksi *P.falciparum* stadium ring form
Panah merah: eritrosit terinfeksi *P.falciparum* stadium schizont
(pemulasan Giemsa, pembesaran 1000 x)



Gambar 11. Proses sinkronisasi pada kultur *P.falciparum*

Panah hitam : eritrosit terinfeksi *P.falciparum* stadium schizont
Panah biru : hemozoin (pemulasan Giemsa, pembesaran 1000 x)



Gambar 12. Proses sinkronisasi pada kultur *P.falciparum*

Panah hitam : eritrosit terinfeksi *P.falciparum* stadium schizont,
Panah biru : hemozoin yang berwarna hijau kecoklatan
(pemulasan Giemsa, pembesaran 1000 x)

DISKUSI

Derajat Parasit

Hasil uji ANOVA didapatkan penurunan derajat parasit yang signifikan ($p = 0,000$) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (*Chloroquine*, Artemisinin dan ekstrak biji Nimba). Pada kelompok *Chloroquine* hal ini berkaitan dengan mekanisme kerja *Chloroquine* menurunkan derajat parasit melalui kemampuan menghalangi sintesa enzim parasit dalam pembentukan DNA dan RNA sehingga proses pembelahan terganggu, selain itu *Chloroquine* berikatan dengan *heme* yang akan menghambat pembentukan *hemozoin*, sehingga *heme* tetap terakumulasi dalam bentuk *free heme* yang bersifat toksik dan mengakibatkan kematian *Plasmodium* (3,9,18,19,20).

Artemisinin diketahui mempunyai struktur molekul yang mengandung jembatan peroksida (*peroxide bridge*), mekanisme kerja Artemisinin menurunkan derajat parasit sangat berkaitan dengan struktur molekulnya yang pada proses digesti haemoglobin diputus oleh ion Fe^{2+} menjadi radikal bebas yang sangat reaktif. Radikal-radikal Artemisinin ini kemudian menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam *Plasmodium* yang mengakibatkan *Plasmodium* tersebut mati (12,21). Penelitian lain menjelaskan mekanisme kerja Artemisinin melalui penghambatan enzim *the malarial calcium-dependent ATPase* (*PfATP6*) yang terletak dalam kompartemen intrasel terbungkus membran yang disebut retikulum endoplasma. Pada *Plasmodium*, kompartemen ini tersebar luas dalam sitoplasma di luar *food vacuole*. Radikal bebas yang dihasilkan Artemisinin mengikat dan menghambat *PfATP6* secara ireversibel dan spesifik sehingga mengakibatkan pertumbuhan parasit terhambat. (22).

Pada penelitian ini kemampuan ekstrak biji Nimba menurunkan derajat parasit secara signifikan diduga karena adanya beberapa zat aktif dalam biji Nimba yang mempunyai aktifitas antimalaria seperti *Azadirachtin*, *Nimbolide* (7,13,23,24,25,26).

Pemberian konsentrasi yang berbeda pada kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan signifikan dalam menurunkan derajat parasit ($p = 0,99$), hal ini disebabkan karena dosis masing-masing konsentrasi terlalu besar, disamping itu dosis konsentrasi awal perlu diperkecil atau diturunkan.

Hasil uji Tukey diantara kelompok perlakuan terhadap penurunan derajat parasit tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p \geq 0,05$), tetapi jika dilihat dari kurva penurunan derajat parasit pada kontrol dan kelompok perlakuan tampak kecenderungan kelompok ekstrak biji Nimba lebih kuat menurunkan derajat parasit dibandingkan dengan kelompok *Chloroquine* dan Artemisinin, begitu juga dilihat dari data deskriptif, penurunan derajat parasit pada kelompok ekstrak biji Nimba paling optimal dicapai pada konsentrasi $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($1,46 \pm 0,118$) karena dengan penambahan konsentrasi yang lebih besar ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$ dan $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) hasil penurunan derajat parasit tidak jauh berbeda ($1,34 \pm 0,067$ dan $1,21 \pm 0,070$), sedangkan pada kelompok *Chloroquine* dan Artemisinin untuk penurunan derajat parasit yang optimal dicapai pada konsentrasi $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ (*Chloroquine* $1,31 \pm 0,144$ Artemisinin $1,71 \pm 0,312$). Hasil uji regresi juga menunjukkan perbedaan respon penurunan derajat parasit terhadap peningkatan konsentrasi obat diantara kelompok perlakuan. Respon paling rendah ternyata pada kelompok

Chloroquine (0,3593), pada kelompok Artemisinin (0,6603) dan pada kelompok ekstrak biji Nimba (0,5237). Hal ini menunjukkan bahwa kecenderungan kemampuan ekstrak biji Nimba menurunkan derajat parasit lebih baik dari *Chloroquine* walaupun tidak mencapai keefektifan seperti Artemisinin.

Hemozoin

Hasil uji ANOVA antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan didapatkan penurunan jumlah *hemozoin* yang signifikan ($p = 0,000$). Hal ini membuktikan bahwa salah satu mekanisme kerja *Chloroquine* dan Artemisinin adalah menghambat pembentukan *hemozoin*. (3,9,12,18,20,21,22). Kemampuan *Chloroquine* secara selektif terakumulasi dalam *food vacuole* *Plasmodium* melalui mekanisme (i) *protonation* dan *ion trapping* disebabkan karena pH yang lebih rendah dalam *food vacuole*, (ii) pengambilan aktif *Chloroquine* oleh *parasite transporter* (CDR dan MDR1) dan (iii) ikatan *Chloroquine* dengan reseptor spesifik dalam *food vacuole*. Didalam *food vacuole* *Plasmodium*, *Chloroquine* akan menghambat pembentukan *hemozoin* dari *heme* yang berasal dari penyerapan hemoglobin, *free heme* akan menyebabkan kerusakan membran dan menyebabkan kematian parasit (27). *Hemozoin* merupakan polimer *heme* yang berkaitan dengan sensitifitas Artemisinin, hal ini ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan terhadap *RC strain P.berghei*, didapatkan hasil bahwa Artemisinin tidak aktif disebabkan karena kurangnya kadar *hemozoin* yang terdapat pada *RC strain P.berghei* (28). Artemisinin mampu menghambat biosintesis *hemozoin*, pada penelitian yang dilakukan terhadap *cel free condition* pada konsentrasi mikro molar (μM) mampu menghambat pembentukan *hemozoin* (3).

Pada penelitian ini ekstrak biji Nimba terbukti mampu menurunkan jumlah *hemozoin* secara signifikan. Meskipun mekanisme ekstrak biji Nimba menghambat pembentukan *hemozoin* belum diketahui secara pasti melalui polimerisasi *heme* seperti *Chloroquine* atau berinteraksi dengan *heme* seperti Artemisinin, diduga karena kemiripan struktur kimia zat aktif yang terdapat didalam Artemisinin (*sesquiterpen lactone*) dan ekstrak biji Nimba (*triterpenoid*).

Hasil uji Tukey diantara kelompok perlakuan terhadap penurunan jumlah *hemozoin*, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p \geq 0,05$). Pada kurva *hemozoin* tampak penurunan jumlah *hemozoin* paling optimal dicapai semua kelompok perlakuan pada konsentrasi $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, tetapi hasil uji regresi menunjukkan perbedaan respon penurunan jumlah *hemozoin* terhadap peningkatan konsentrasi obat diantara kelompok perlakuan. Respon paling rendah pada kelompok *Chloroquine* (0,0006), pada kelompok Artemisinin (0,0008) dan pada kelompok ekstrak biji Nimba (0,0007). Hal ini menunjukkan kecenderungan bahwa kemampuan ekstrak biji Nimba menurunkan jumlah *hemozoin* lebih baik dari *Chloroquine* walaupun tidak mencapai keefektifan seperti Artemisinin.

Peranan penting *hemozoin* dalam penelitian obat malaria dilakukan dengan pengukuran secara kualitatif dan kuantitatif. Ada beberapa metode yang lazim digunakan untuk mengukur *hemozoin* yaitu *Spectroscopy* (untuk melihat phagocytosis eritrosit dan *hemozoin*), *spectrophotometric* (spesifik untuk *hemozoin* yang berasal dari *heme* tetapi kurang sensitif), dan *fluorescence* (untuk mendeteksi *hemozoin* yang terdapat di jaringan).

Pada penelitian ini metode yang digunakan adalah *pyridine haemochrome assay*. Metode ini memang dipakai untuk melihat mekanisme kerja obat, karena lebih sensitif dibandingkan dengan metode yang lain dan mudah dilakukan tetapi prosesnya harus dilakukan secara cepat karena sifat *pyridine* yang toksik dan tidak stabil (9,18,29). Meskipun demikian masih ada kendala yang menyertai pengukuran *hemozoin* pada penelitian ini, beberapa jurnal menyebutkan bahwa pengukuran *hemozoin* sering gagal disebabkan karena sifat pellet *hemozoin* yang menempel pada bahan plastik sehingga mempengaruhi keakuratan pengukuran, oleh karena itu alat yang digunakan untuk mengukur *hemozoin* sebaiknya non pyrogen, kemungkinan faktor inilah yang diduga menyebabkan tidak adanya perbedaan signifikan jumlah *hemozoin* pada kelompok perlakuan.

Korelasi antara penurunan jumlah *hemozoin* dengan penurunan derajat parasit

Hasil uji korelasi Pearson didapatkan korelasi positif yang kuat dan signifikan ($r = 0,970$, $p = 0,000$) antara penurunan jumlah *hemozoin* dengan penurunan derajat parasit. Korelasi positif berarti apabila jumlah *hemozoin* menurun maka derajat parasit *menurun*, jumlah *hemozoin* meningkat maka derajat parasit akan meningkat pula. Seperti diketahui fungsi *hemozoin* untuk mencegah kerusakan parasit dari oxygen radikal atau mengantisipasi perubahan fungsi dari oksigen bebas terhadap kemungkinan kerusakan parasit. Pembentukan *hemozoin* pada dasarnya mengubah kandungan reaktif Fe pada proses oksidasi dan lingkungan asam didalam *food vacuole* parasit dimana hemoglobin didegradasi. Radikal oksigen bebas berupa superokide (O_2^-), peroxida (O_2^{2-}) dan radikal hidroksi (HO^-) dapat meningkatkan penghancuran terhadap makromolekul seluler dan lipid. Radikal O_2^- bersama-sama dengan iNOS dapat melakukan oksidasi phagosit yang didalam *acidic phagosome* menghasilkan radikal peroksinitrit sangat reaktif yang dapat membunuh parasit. (30).

Dengan jumlah *hemozoin* yang meningkat diasumsikan *Plasmodium* dapat melakukan proses detoksifikasi heme dengan baik sehingga *Plasmodium* tetap hidup (derajat parasit meningkat). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (pada hewan coba) yang menyebutkan bahwa pada jaringan yang ditemukan jumlah *hemozoin* yang tinggi ternyata didapatkan derajat parasit tinggi juga (18,31). Keterkaitan *hemozoin* dengan parasitemia menarik peneliti untuk mengungkap peran *hemozoin*, beberapa peneliti menyatakan bahwa *hemozoin* yang terdapat

dalam leucocyte (*neutrophil* dan *monocyte*) dapat dijadikan indikator *prognostic* penyakit. Seperti yang diteliti oleh Amadu et al., 1998 pada penderita malaria asimptomatis, malaria tanpa komplikasi, dan malaria serebral ditemukan *hemozoin* yang terdapat dalam neutrofil meningkat dari 7%, 9 %, dan 27 % (32). Penelitian pada 146 anak Nigerian yang menderita malaria, ditemukan lebih dari 90 % *hemozoin* terdapat pada neutrophil dan monocyte (32). Metzger et al., tahun 1995 meneliti 104 penderita malaria yang dirawat di RS, didapatkan 83 % *hemozoin* dalam *monocyte* dan 53 % *hemozoin* dalam *neutrophil* (33). Pada kasus malaria serebral dimana pemeriksaan hapusan darah (*smear*) negatif, jumlah *hemozoin* dalam *monocyte* dapat digunakan sebagai indikator peningkatan derajat parasit (*high grade parasitemia*) (27).

KESIMPULAN

1. Ekstrak biji Nimba dapat menurunkan derajat parasit dan jumlah *hemozoin* pada kultur *P.falciparum*.
2. Pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak biji Nimba menurunkan derajat parasit secara optimal, sedangkan penurunan jumlah *hemozoin* secara optimal dicapai pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$.
3. Kemampuan ekstrak biji Nimba menurunkan derajat parasit dan jumlah *hemozoin* pada kultur *P.falciparum* lebih baik dari *Chloroquine* walaupun tidak mencapai keefektifan seperti Artemisinin.
4. Terdapat hubungan yang kuat antara penurunan jumlah *hemozoin* dengan penurunan derajat parasit pada kultur *P.falciparum*.

SARAN

1. Kemampuan ekstrak biji Nimba menurunkan derajat parasit diduga karena adanya zat aktif yang mempunyai efek anti malaria yaitu azadirachtin, nimbolide dan gedunin, perlu penelitian lebih lanjut tentang farmakokinetic dan farmakodinamik zat aktif tersebut
2. Perlu dilakukan penelitian uji toksisitas ekstrak biji Nimba pada hewan coba.
3. Penelitian lebih lanjut untuk memperjelas mekanisme kerja ekstrak biji Nimba dalam menghambat pembentukan *hemozoin* pada kultur *P.falciparum*.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Schneider EL, Carlson HK, Chang HH. *Heme Detoxification In P. falciparum*. Berkeley:The Marletta Lab. University of California; 2003.
2. Trijoko. *Pemberian Ekstrak Daun Mimba (Azadirachta indica) Pada Mencit Yang Terinfeksi Plasmodium berghei*. [Thesis]. Yogyakarta: UGM. 1995.
3. Pandey AV and Chauhan VS. *Heme Polymerization by Malarial Parasit: A Potensial Target For Antimalarial Drug Development*. India: International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology; 2000.
4. Biswas K, Chatyopadhyay I, Baherjee RK, and Bandyopadhyay U. *Biological Activities And Medicinal Properties Of Neem (Azadirachta indica)*. Current Science 2002; 82 (11).
5. Khosla P, Bhanwra S, Singh J, Seth S and Srivastava RK. *A Study Of Hypoglycaemic Effect Of A.Indica (Neem) In Normal And Alloxan Diabetic Rabbits*. Indian Journal Physiol.Pharmacol; 2000; 44: 69-74.
6. Badani L, Deolankar RP, Kulkarni MM, Nagsampli BA and Wagh UV. *Indian Journal Malariaology* 1987.
7. Khalid SA, Duddeck H, Gonzales- Sierra H. *Isolation And Characterization Of An Antimalarial Agent Of The Neem Tree Azadirachta indica*. PubMed; 1989; 922-926.

8. Dhar R, Zhang K, Talwar GP, Garg S and Srivastava RK. *Journal Ethnopharmacol* 1989; 61: 31-33.
9. Meshnick SR. *Artemisinin And The Anti Malarial Endoperoxides, From Herbal Remedy To Targeted Chemotherapy*. Microbiology Review; 1996; 60: 301-315.
10. Harijanto PN. *Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinik & Penanganannya*. Jakarta: EGC; 2000.
11. Lombardini. *Antiparasitic Drugs-The Chemotherapy of Malaria*. 2003.
12. Hoon LJ. *Artemisinin & Its Derivatives For Antimalarial Agents*. 2000. synmed.snu.ac.kr/courses/graduate/di
13. Bickii J, Njifutie N, Foyere JA, Basco LK, Ringwald P. *In Vitro Antimalarial Activity Of Limonoids From Khyagrandidifoliola (meliaceae)*. *Journal Ethnopharmacol* 2000.
14. Castellanos L, Correa RS, Martinez E, and Calderon JS. *Oleanane Triterpenoids From Cedrela Montana (Meliaceae)*. *J. Znaturforsch* 2002: 575-578.
15. Tantular IS, Suhintom P, Hidajati BS, Dachlan P. *Biakan Berkesenambungan Plasmodium falciparum Stodium Eritrosit*. *Jurnal Biologi Molekuler Kedokteran*; 2000; 99-111.
16. Lambros C, Vanderberg JP. *Synchronization of Plasmodium falciparum Erythrocytic Stages In Culture*. *J. Parasitology* 1976; 65: 418 – 420.
17. Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H, Scharf A. *Methods In Malaria Research*. Third Edition. MR4/ATCC, Manassas Virginia; 2000; 32-33
18. Sullivan DJ, Gluzman Ilya Y, Russell DG and Goldberg DE. *On The Molecular Mechanism Of Chloroquine's Antimalarial Action*. Medical sciences, 1996; 93: 11865 – 11870.
19. Rosenthal PJ and Mesnick SR. *Hemoglobin Catabolism And Iron Utilization By Malaria Parasites*. Molecular and Biochemical Parasitology; 1996.
20. Hempelmann E and Egan TJ. *Pigment Biocrystallization in Plasmodium falciparum*. Trends in Parasitology 2002; 18 (1) : 11.
21. Robert A and Meunier B. *Alkylating Properties Of Antimalarial Artemisinin Derivatives And Synthetic Trioxanes When Activated By Reduced Heme Model*. *Chem.Eur Journal*, 2001; 4: 1287-1296
22. Ludwig et al. *Artemisinins Target The SERCA of Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2003; 424.
23. Jones IW, Ley SV, Denholm AA, Lovell H, Wood A and Sinden RE. *Sexual Development Of Malaria Parasites Vitro By Neem Extract And Its Semi-Synthetic Analogues*. *FEMS Microbiology* 15, 1994.
24. Rochanakij S, Thebtaranonth Y, Yanjai C and Yutharong J. *Nimbotide, A Constituent Of Azadirachta indica Inhibits Plasmodium falciparum Culture*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1995.
25. McKinnon S, Durst T, Arناس JT, Angerhoferc, Pezzuto J, Sanchez – Vindas PE. *Antimalarial Activity Of Tropical Meliaceae Extract And Gedunin Derivates*. *Journal Natural Product* 1997; 60.
26. Omar S, Zhang J, MacKinnon S, Leaman D, Durst T, Philogene BJR, Arnason JT, Sanches-Vindas PE, Poveda L, Tames PA, Pezzuto J. *Traditionally Used Antimalarials From The Meliaceae, Current Topics In Medicinal Chemistry*, 2003; 3(2): 133- 139.
27. Sullivan Jr. *Hemozoin: A Biocrystal Synthesized during the degradation of Hemoglobin*. In *Biopolymers vol 9, Miscellaneous Biopolymers anda Biodegradation of Synthetic Polymers*. Matsumura and A Steinbuchel Series Editor Wiley-UCH Verlag. Weiheim Germany: Gonbths & Co; 2002; 129-163.
28. Peters W, Lin I, Robinson BL & Walruss DC. *The Chemotherapy Of Rodent Malaria, XL. The Action Of Artemisinin And Related Sesquiterpenes*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 1996; 80, 483-489.
29. Tripathi AK, Khan SI, Walker LA, Tekwani BL. *Spectrophotometric Determination Of De Novo Hemozoin /βhematin Formation An In Vitro Assay*. *J.Analytical Biochemistry*, 2003; 325, 85 -91.
30. Abbas AK, Andrew HL, Pober JP. *Cellular and Molecular Immunology*. Fourth Edition. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2000.
31. Roth EF Jr, Brotman DS, Vanderberg JP, Schulman S. *Malarial Pigment Error In The Estimation of Hemoglobin Content in Plasmodium falciparum Infected Red Cell: Implications For Metabolic And Biochemical Studies of the Erythrocytic Phases of Malaria*. *Am.J.Trop.Med. Hyg*. 1986; 35(5): 906-911.
32. Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Ghadegesin RA. *Intraleucocytic Malaria Pigment And Clinical Severity Of Malaria In Children*. *The Pediatric Infectious disease Jurnal*. www.pidj.com/pj/re/pidj/fulltext.00006454-200012000-00016.htm.
33. Metzger WG, Mordmuller BG, Kremsner PG. *Malaria Pigment In Leucocytes*. *Trns,R.Soc,Trop,Med,Hyg*; 1995; 89 : 637-638