

Penurunan Laktat Dehidrogenase *Plasmodium falciparum* strain D10 pada pemberian Fraksi *Tithonia diversifolia* (Hemsley)

Tithonia diversifolia (Hemsley) A.Gray Fractions lower Lactate Dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* strain D10

Rul Afyah Syarif*, Mae Sri Hartati Wahyuningsih, Mustofa, Ngatidjan

Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada

Corresponding author: Rul Afyah Syarif: Email: rulafiyah@ugm.ac.id

Submitted: 14-07-2020

Revised: 05-10-2020

Accepted: 05-10-2020

ABSTRAK

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa fraksi ke-6 (F6) merupakan fraksi aktif (F-akt) daun *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray yang menghambat pertumbuhan *Plasmodium*. Pertumbuhan parasit ini memerlukan energi yang diperoleh dari aktivitas laktat dehidrogenase (LDH). Penelitian ini bertujuan mengkaji aktivitas antiplasmodium fraksi aktif *T. diversifolia* terhadap kadar LDH kultur *P. falciparum*. Kultur *Plasmodium falciparum* strain D10 stadium cincin dibagi menjadi kelompok eritrosit tidak terinfeksi (KTI), eritrosit terinfeksi (KI), dan eritrosit terinfeksi *Plasmodium* yang diberi F6 (F-akt) *T. diversifolia* (KI+F-akt) konsentrasi 9,38-150 µg/mL. Kultur diinkubasi 48 jam. Media kultur diukur kadar LDH-nya secara enzimatik. Adanya perbedaan LDH antar kelompok dianalisa dengan Anova. Penghambatan aktivitas LDH (IC₅₀) ditetapkan dengan analisa probit. Kadar LDH kelompok KI (362,33 ± 133,18 U/L) lebih tinggi daripada KTI (270,33 ± 65,85 U/L) (p>0,05). Pemberian F-akt pada KI menyebabkan kadar LDH parasit lebih rendah daripada KI. Kadar LDH parasit yang diberi F-akt konsentrasi 9,38; 18,75; 37,50; dan 150 µg/mL secara berturut-turut adalah 365,5 ± 129,5; 210,5 ± 1,5; 195,5 ± 81,5; dan 111,5 ± 53,5 U/L. Tidak ada perbedaan kadar LDH antar kelompok penelitian (p>0,05). F-akt *T. diversifolia* mampu menghambat LDH *P. falciparum* strain D10 dengan nilai IC₅₀ = 39,22 µg/mL.

Kata kunci: *Tithonia diversifolia*; laktat dehidrogenase; *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

The previous research showed that 6th fraction (F6), an active fraction (F-akt), of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray leaves inhibited the *Plasmodium* growth. The growth of parasites requires energy obtained from the lactate dehydrogenase (LDH) activity. This study aimed to investigate the F6 (an active fraction) of *T. diversifolia* antiplasmodial activity on LDH levels of *P. falciparum*. The ring stage of *P. falciparum* D10 strain culture was divided into 3 groups, that were *Plasmodium*-uninfected erythrocytes (KTI), *Plasmodium*-infected erythrocytes (KI), and *Plasmodium*-infected erythrocytes treated by F-akt of *T. diversifolia* (KI+F-akt) 9.38-150 µg/mL. The culture was incubated 48 h, the LDH in culture medium then was measured enzymatically. The difference of LDH level among groups was analyzed statistically using Anova. The LDH activity inhibition (IC₅₀) was determined by probit analysis. The LDH level of KI group (362.33±133.18 U/L) was higher than KTI (270.33± 65.85 U/L) (p>0.05). LDH levels of KI+F-akt groups were lower than KI. The LDH level of *P. falciparum* treated by F-akt 9.38; 18.75; 37.50; and 150 µg/mL were 365.5±129.5; 210.5±1.5; 195.5±81.5; and 111.5±53.5 U/L, respectively. There were no differences in LDH levels among study groups (p>0.05). F-akt of *T. diversifolia* inhibits LDH of *P. falciparum* strain D10 with IC₅₀ value = 39.22 µg/mL.

Keywords: *Tithonia diversifolia*; lactate dehydrogenase; *Plasmodium falciparum*.

PENDAHULUAN

Resistensi terhadap antimalaria konvensional yang semakin luas berakibat pengendalian dan pengobatan malaria semakin

rumit. Untuk mengatasi resistensi ini maka penemuan antimalaria baru sangat diperlukan baik berupa senyawa sintesis maupun dari bahan alam. Antimalaria sintesis kinin dan

artemisinin merupakan contoh antimalaria yang awalnya bersumber dari tanaman. Penemuan senyawa baru dari tanaman yang secara empirik bermanfaat untuk menanggulangi malaria diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam mengatasi resistensi terhadap obat konvensional klorokuin.

Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray secara empirik digunakan untuk mencegah dan mengobati malaria. Penelitian sebelumnya didapatkan bahwa ekstrak metanol dan fraksi daun *T. diversifolia* mempunyai aktivitas antiplasmodium, dan aktivitas terbaik dimiliki oleh fraksi 6 (F6) (Syarif dkk., 2008; Syarif dkk., 2018). Informasi terkait target kerja fraksi *T. diversifolia* sebagai antiplasmodium sangatlah bermanfaat bila tanaman ini dikembangkan lebih lanjut sebagai obat dari bahan alam.

Target untuk antiplasmodium dapat berlangsung intrasel (di dalam *Plasmodium*) maupun ekstrasel. Target intrasel terjadi di sitosol, membran, vakuola digesti, mitokondria, dan apikoplas sedangkan ekstrasel dengan cara obat invasi ke eritrosit (Kalra dkk., 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Syarif dkk., (2018) mendapatkan bahwa secara *in vitro* fraksi 5, fraksi 6, dan fraksi 7 *T. diversifolia* menghambat polimerisasi heme dalam vakuola digesti. Heme yang tidak dipolimerisasi berakibat matinya parasit tersebut.

Agar bertahan hidup, *Plasmodium* memerlukan energi yang diperoleh dari metabolisme glukosa melalui proses glikolisis. Laktat dehidrogenase (LDH) merupakan enzim yang terlibat dalam tahap akhir glikolisis (Pradhan dkk., 2009). Dengan demikian keberadaan dan penghambatan aktivitas LDH berpengaruh terhadap kelangsungan hidup *Plasmodium* dan LDH menjadi target potensial dalam pengembangan obat baru antimalaria (Kalra dkk., 2006).

LDH mengkatalisis secara reversibel perubahan piruvat menjadi laktat. Reduksi piruvat menjadi laktat ini disertai dengan oksidasi NADH menjadi NAD⁺, koenzim yang diperlukan untuk memproduksi ATP (Valvona dkk., 2016). Penghambatan LDH memblokir regenerasi NAD⁺ dan mencegah pembentukan ATP (Premlata dkk., 2012) sebagai sumber energi *Plasmodium*. Untuk itu penelitian ini bertujuan mengkaji aktivitas antiplasmodium

F6 *T. diversifolia* terhadap kadar LDH pada kultur *P. falciparum*.

METODOLOGI

Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK UGM No KE/FK/18/EC. Penelitian eksperimental laboratorium dilakukan pada *P. falciparum* secara *in vitro* sebagai subyek penelitian dengan rancangan *post-test control group only design*.

Daun *T. diversifolia* diperoleh dari Pakem, Sleman, Yogyakarta dan dideterminasi di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Pembuatan fraksi *T. diversifolia* dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Terapi, kultur *P. falciparum* strain D10 dan uji penghambatan LDH dilakukan di Laboratorium Parasitologi, serta pengukuran LDH di Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

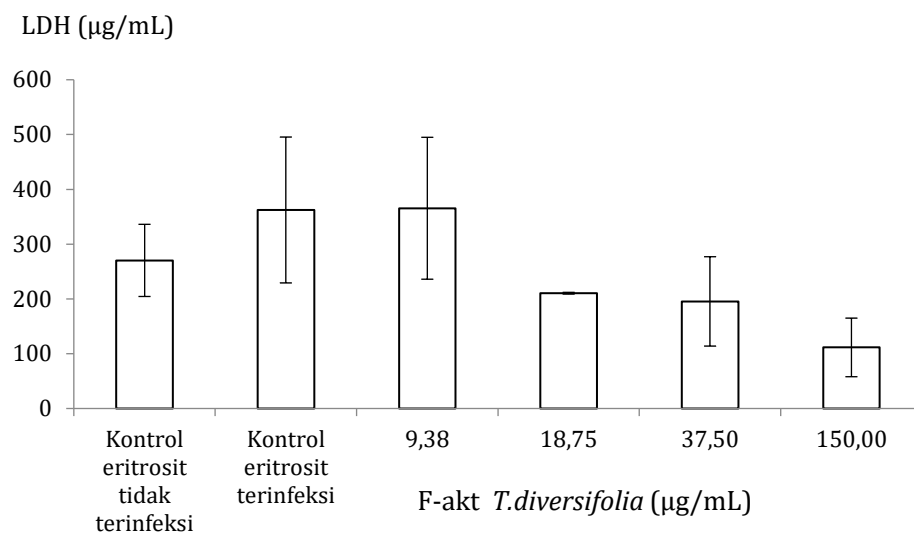
Cara Penelitian

Fraksinasi *T. diversifolia*

T. diversifolia dikeringkan dalam oven bersuhu 50°C kemudian diblender untuk mendapatkan serbuk. Pembuatan fraksi dilakukan seperti pada penelitian sebelumnya (Syarif dkk., 2018). Fraksi 6 yang diketahui mempunyai aktivitas antiplasmodium terbaik pada penelitian sebelumnya selanjutnya disebut fraksi aktif (F-akt) (Syarif dkk., 2018), dilakukan uji penghambatan LDH dalam penelitian ini.

Kultur *Plasmodium falciparum*

Aktivitas senyawa uji *T. diversifolia* pada *P. falciparum* untuk mengukur pembentukan enzim LDH dilakukan pada mikroplate 96-sumuran. Suspensi *P. falciparum* (100 µL) stadium cincin dengan parasitemia 1% dan hematokrit 1,5% didistribusikan pada tiap sumuran 96-microplate. Sinkronisasi *Plasmodium* stadium cincin dilakukan menggunakan sorbitol 5% (Contreras dkk., 2004). Ada 3 kelompok kultur dalam penelitian ini yaitu kelompok eritrosit tidak terinfeksi *Plasmodium* (KTI), kelompok terinfeksi *Plasmodium* (KI), dan kelompok terinfeksi *Plasmodium* yang diberi F-akt *T. diversifolia* (KI+F-akt) konsentrasi 9,38; 37,5; 18,75 dan



Gambar 1. Kadar LDH ± SEM *P. falciparum* strain D10 setelah pemberian F-akt *T. diversifolia*

150 µg/mL. Tiap uji dilakukan duplikat. Mikroplate kultur diinkubasi selama 48 jam, CO₂ 5 %, suhu 37°C. Supernatan dikumpulkan untuk pengukuran LDH.

Pengukuran laktat dehidrogenase

Masing-masing sampel uji sebanyak 10 µL diukur kadar LDH-nya secara enzimatik menggunakan metode dari Synchron CX® Systems (Anonim, 2008). Aktivitas laktat dehidrogenase diukur menggunakan reagen laktat dehidrogenase (LD-P) yang mengkatalisis reduksi secara reversibel piruvat menjadi laktat disertai oksidasi NADH menjadi NAD+. Synchron CX® Systems secara otomatis menyesuaikan volume sampel dengan reagen yang dimasukkan ke dalam kuvet dengan rasio sampel:reagen adalah 1:50. Sistem pemonitor perubahan absorbansi pada panjang gelombang 340 nm. Absorbansi yang terukur berbanding lurus dengan aktivitas LD-P dan hal ini digunakan System untuk menghitung dan mengekspresikan aktivitas LDH.

Analisa Hasil

Data LDH ditampilkan secara deskriptif. Perbedaan rata-rata kadar LDH akibat pemberian F-akt *T. diversifolia* berbagai konsentrasi dianalisa dengan ANOVA program SPSS versi 13.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Kadar LDH kelompok KI (362,33 ± 133,18 U/L) lebih tinggi daripada KTI (270,33 ± 65,85 U/L) ($p > 0,05$). Pemberian F-akt pada KI menyebabkan kadar LDH parasit lebih rendah, dan semakin tinggi konsentrasi F-akt yang diberikan maka kadar LDH semakin rendah. Kelompok KI+F-akt konsentrasi terendah menunjukkan kadar LDH yang hampir sama dengan KI. Kadar LDH parasit yang diberi F-akt konsentrasi 9,38; 18,75; 37,50; dan 150 µg/mL secara berturut-turut adalah 365,5 ± 129,5; 210,5 ± 1,5; 195,5 ± 81,5; dan 111,5 ± 53,5 U/L (Gambar 1). Tidak ada perbedaan kadar LDH antar kelompok penelitian ($p > 0,05$)

Semakin tinggi konsentrasi F-akt yang diberikan pada KTI menunjukkan penghambatan pembentukan LDH yang semakin besar (Tabel I). Konsentrasi F-akt yang mampu menghambat sintesis LDH sebesar 50% (IC₅₀) adalah 39,22 µg/mL.

Pembahasan

Selama siklus intraeritrosit *Plasmodium* mendapatkan energi melalui metabolisme glukosa (glikolisis). Laktat dehidrogenase merupakan enzim terminal dalam glikolisis yang mengubah piruvat menjadi laktat dengan kofaktor NADH. LDH mengkatalisis secara

Tabel I . Kadar LDH dan persentase penghambatan pembentukannya pada *P. falciparum* strain D₁₀ setelah pemberian F-akt *T. diversifolia*

F-akt <i>T. diversifolia</i> (µg/mL)	Rata-rata LDH ± SEM (U/L)	Nilai p LDH	% penghambatan LDH ± SEM	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
9,38	365,5 ± 265,84	p>0,05	-	39,22
18,75	210,5 ± 97,59		41,92 ± 79,37	
37,50	195,5 ± 128,44		46,07 ± 66,96	
150	111,5 ± 55,81		69,25 ± 26,67	
KI	362,33 ± 133,18			
KTI	270,33 ± 65,85			

reversibel perubahan piruvat menjadi laktat. Reduksi piruvat menjadi laktat dalam tubuh manusia disertai dengan oksidasi NADH menjadi NAD⁺ yang selanjutnya digunakan untuk memproduksi ATP (Garba & Ubom, 2005; Valvona dkk., 2017). 3-acetyl pyridine adenine dinucleotide (APAD⁺) dalam *Plasmodium* merupakan analog koenzim NAD⁺ manusia. Seperti halnya dalam tubuh manusia, LDH *Plasmodium* (pLDH) mengkatalisis secara reversibel perubahan piruvat menjadi laktat dan mengubah APADH menjadi APAD⁺ (Kalra dkk., 2006).

Sebelum diberi perlakuan, kultur *P. falciparum* disinkronisasi menjadi stadium cincin. Setelah 48 jam inkubasi dengan F-akt, medium kultur dikumpulkan untuk pemeriksaan LDH. Inkubasi 48 jam dipilih karena aktivitas maksimal LDH terjadi ketika kultur *Plasmodium* diinkubasi 36 – 48 jam, yaitu saat stadium trofozoit dan skizon lebih dominan karena stadium cincin telah berkembang menjadi stadium tersebut. Selain dipengaruhi oleh lama inkubasi, aktivitas pLDH juga berhubungan dengan jumlah parasit dalam plasma darah (parasitemia) dan kadar hematokrit. Aktivitas LDH dapat dideteksi bila parasitemia 1-2% dan hematokrit 1,5% (Basco dkk., 1995; Verma dkk., 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Vivas dkk., (2005) mendapatkan bahwa aktivitas pLDH dan ekspresi RNA pLDH *P. falciparum* stadium trofozoit lebih besar daripada stadium cincin, dan pada stadium trofozoit lebih peka terhadap antimalaria OXD1. Hal ini dimungkinkan berkaitan dengan kenaikan kebutuhan energi stadium trofozoit yang konsisten dengan kenaikan glikolisis sebagai jalur metabolisme esensial untuk kelangsungan hidup *Plasmodium* stadium ini.

LDH merupakan enzim esensial di semua organ tubuh, yang terletak dalam sitosol (intrasel). Adanya LDH dalam medium atau ekstrasel menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan atau kematian sel, dalam hal ini eritrosit dan atau *Plasmodium* (Cobben dkk., 1997). LDH yang terukur dalam sampel dengan menggunakan metode dari Synchron CX@ Systems dimungkinkan adalah pLDH dan *human* LDH (hLDH) karena metode ini tidak spesifik mengukur hanya pLDH.

Kadar LDH pada KI lebih tinggi dibandingkan dengan KTI maupun KI+F-akt. Hal ini dapat terjadi karena ambilan glukosa pada eritrosit terinfeksi *Plasmodium* 30-50 kali lebih besar daripada yang tidak terinfeksi, dan hampir semua glukosa ini diubah menjadi laktat (Jensen dkk., 1983 *cit.*, Vivas dkk., 2005). Aktivitas metabolisme yang tinggi ini tercermin dalam bentuk tingginya kadar LDH pada eritrosit terinfeksi (Roth, 1990 *cit.*, Vivas dkk., 2005).

Kelompok KI+F-akt konsentrasi terendah menunjukkan kadar LDH yang hampir sama dengan KI. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi terendah F-akt tidak mampu membunuh *Plasmodium*. Lain halnya dengan konsentrasi F-akt yang lebih tinggi. Kelompok KI+F-akt menunjukkan kadar LDH yang semakin bertambah rendah dengan semakin tingginya konsentrasi F-akt. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi F-akt maka semakin tinggi *Plasmodium* yang mati di waktu awal inkubasi sehingga tidak menginfeksi eritrosit lainnya. Akibatnya di akhir inkubasi lebih banyak eritrosit yang utuh dan tidak lisis. Selain tidak menginfeksi eritrosit lain, kadar LDH yang lebih rendah pada KI+F-akt daripada KTI kemungkinan karena F-akt mempunyai efek

proteksi sehingga eritrosit dapat bertahan lama (tidak lisis). Namun untuk membuktikan hal ini perlu sediaan apus darah yang sayangnya tidak dilakukan dalam penelitian ini.

Penelitian ini mendapatkan bahwa IC₅₀ F-akt dalam menghambat kadar LDH *P. falciparum* strain D10 (sensitif klorokuin) sebesar 39,22 µg/mL. Nilai ini lebih tinggi daripada IC₅₀ F-akt (13,63±1,43 µg/mL) dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* strain FCR3 (strain resisten klorokuin) yang diperoleh dengan cara menghitung parasitemia sediaan apusan darah menggunakan mikroskop cahaya. Meskipun pengukuran LDH juga dapat dipakai untuk mengetahui aktivitas antiplasmodium suatu senyawa, namun IC₅₀ yang diperoleh tidak sama. Hal ini dapat disebabkan strain *Plasmodium* yang berbeda atau F-akt *T. diversifolia* lebih spesifik bekerja/berefek pada *P. falciparum* resisten klorokuin. Jumlah pengulangan percobaan yang terbatas (hanya 2) dalam penelitian ini sehingga menyebabkan SEM yang besar juga merupakan salah satu penyebab IC₅₀ LDH lebih besar daripada IC₅₀ aktivitas antiplasmodium secara mikroskopik. Untuk membuktikan hal tersebut sebaiknya dilakukan penelitian mengukur aktivitas penghambatan produksi LDH di *P. falciparum* strain FCR3 dan menambah jumlah pengulangan uji penghambatan LDH.

KESIMPULAN

F-akt menghambat aktivitas laktat dehidrogenase *P. falciparum* strain D10 (strain sensitif klorokuin) dengan IC₅₀ sebesar 39,22 µg/mL. Penelitian serupa sebaiknya dilakukan pada *P. falciparum* resisten klorokuin.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih diucapkan kepada Kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian melalui Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran (*Risbin Iptekdok*).

DAFTAR PUSTAKA

Ambre, P.K., Pissurlenkar, R.R.S., Jagyasi, A.S., Ule, R.A., Khedkar, V., Barhatel, C.R., Vivas, L., Tripathi, A.K., Sullivan, D., Birkinshaw, R., Brady, L., Iyer, K., and Coutinho, E.C. 2012. Molecular Modeling Studies, Synthesis and Biological Evaluation of Novel *Plasmodium falciparum* Lactate

Dehydrogenase (*pf*LDH) Inhibitors. *Anti-Infective Agents* 10: 55-71. <https://www.researchgate.net/publication/259674306>

Anonim. 2008. *SYNCHRON CX® System(s) Chemistry Information Sheet: LD-P Lactate Dehydrogenase*. Beckman Coulter, Inc.

Basco, L.K., Marquet, F, Makler, M.M, Le Bras, J. 1995. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: lactate dehydrogenase activity and its application for in vitro drug susceptibility assay. *Exp Parasitol* 80(2):260-71. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7895836/>

Cobben N. A. M., Drent, M., Schols, A. M. W. J., Lamers R. J. S., Wouters E. F. M., and Van Dieijen-Visser, M. P. 1997. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzyme pattern in ex-coalminers. *Respiratory Medicine* 91: 616-623. <https://www.mendeley.com/catalogue/d7eb36da-5dff-37be-bf66-1bfe2eb8ab19/>

Contreras, C.E., Rivas, M.A., Dominguez, J., Charris, J., Palacios, M., Bianco, N.E., and Blanca, I. 2004. Stage-specifics Activity of Potential Antimalarial Compounds Measured in vitro by Flow Cytometry in Comparison to Optical Microscopy and Hypoxanthine Uptake. *Mem Inst Cruz.* 99(2):179-84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15250472/>

Garba, I.H. dan Ubom, G.A. 2005. Total serum lactate dehydrogenase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Singapore Med J* 46(11):632-634

Grace, N.N., Rainer, B.W., Barbara, G, Erie, N.L., and Victoris, N. 2004. Utilization of Weed Species as Sources of Traditional Medicines in Central Kenya. *Lyonia*, 7(2) : 71-87.

Kalra B.S., Chawla S., Gupta P., and Valecha N. 2006. Screening of antimalarial drugs: An overview. *Indian J Pharmacol* 38 (1): 5-12

Pradhan, A, Tripathi, A.K., Desai, P.V., Mukherjee, P.K., Avery, M.A., Walker, L.A., Tekwani, B.L. 2009. Structure and function of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase: Role of critical amino acids in co-substrate binding

- pocket. *Biochimie* 91: 1509–1517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.09.005>
- Syarif RA, Wahyuningsih MSH, Mustofa, Ngatidjan, Kurniawan H, Al Hilal SR. 2008. Aktivitas antiplasmodium in vitro ekstrak kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray) terhadap *Plasmodium falciparum*. *Majalah Obat Tradisional* 13 (43): 3- 9.
- Syarif, R.A., Wahyuningsih, M.S.H, Mustofa, Ngatidjan. 2018. Antiplasmodial activity and onset speed of growth inhibition of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray leave fractions on *Plasmodium falciparum*. *Trop. J. Pharm* 17 (11): 2213-2218. https://www.tjpr.org/admin/12389900798187/2018_17_11_15.pdf
- Valvona, C.J., Fillmore, H.L., Nunn, P.B., Pilkington, G.J. 2016. REVIEW The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology* 26: 3-17
- Verma, P., Biswas, S., Mohan, T., Ali, S., & Rao, D.N. 2013. Detection of histidine rich protein & lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* in malaria patients by sandwich ELISA using in-house reagents. *Indian J Med Res* 138: 977-987. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24521645/>
- Vivas, L., Easton, A., Kendrick, H., Cameron, A., Lavandera, J.L., Barros, D., de las Heras, F.G., Brady, R.L., and Croft, S.L. 2005. *Plasmodium falciparum*: stage specific effects of a selective inhibitor of lactate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 111(2):105-14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16098967/>