

Hubungan antara kadar klorokuin dan metabolit desetilklorokuin dalam darah dengan parasitemia pada penderita malaria *Plasmodium falciparum* di daerah endemik malaria Purworejo

Relationship between blood level chloroquine, metabolite desethylchloroquine and paracytaemia of *Plasmodium falciparum* infection in malaria endemic area Purworejo

Rina Handayani¹⁾, Iwan Dwi Prahasto²⁾ dan Soesanto Tjokrosonto³⁾

¹⁾ Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM

²⁾ Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran UGM

³⁾ Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM

Abstrak

Klorokuin merupakan *drug of choice* untuk malaria *falciparum*. Di daerah endemik malaria penggunaannya sangat luas di masyarakat, sehingga mengakibatkan timbulnya resistensi di berbagai populasi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui hubungan kadar klorokuin dan metabolit desetilklorokuin dalam darah dengan penurunan parasitemia pada terapi klorokuin dosis standar di daerah endemis.

Penelitian dilakukan di Kecamatan Pituruh Kabupaten Purworejo. Sebanyak 32 subyek diambil dengan cara *active case detection* dan *passive case detection*. Dilakukan pemeriksaan kadar klorokuin, metabolit desetilklorokuin serta pemeriksaan kepadatan parasit yaitu 32 pasien pada H2, HR, H28 dan 10 pasien pada H0,H2,H7,H14,H21,H28. Kadar klorokuin dan desetilklorokuin dalam darah dianalisis dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (*High Performance Liquide Chromatography = HPLC*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa klorokuin telah digunakan secara bebas di masyarakat, terlihat sebelum terapi (H0) terdapat klorokuin dalam darah pada 78,12 subyek, mean kadar H2: 397,7ng/ml (SEM: 38,1), mean prosentase penghambatan parasitemia H2: 93,7% (SEM: 2,07). Hasil analisis korelasi menunjukkan tidak ada hubungan antara kadar klorokuin dan desetilklorokuin dari waktu ke waktu (H0-H28) dengan parasitemia (*P. falciparum*). Kesimpulan peningkatan maupun penurunan kadar klorokuin dan metabolit desetilklorokuin pada infeksi *P falciparum* di daerah endemik malaria tidak meningkatkan maupun menurunkan hambatan kepadatan parasit, hal ini memperkuat dugaan pada subyek telah terjadi resistensi.

Kata kunci: klorokuin , desetilklorokuin – *P falciparum*

Abstract

Chloroquine is the drug of choice for *Plasmodium falciparum* and has long been used as the first line treatment in malaria in Indonesia. However, recent studies show that chloroquine resistance has been found in several endemic area. This study was aimed at investigating the correlation between whole blood chloroquine and desethylchloroquine levels and paracytaemia in the endemic areas.

The study was carried out in Pituruh sub-district of Purworejo district. Thirty two subjects were enrolled using active case detection and passive case detection methods. Inclusion criteria: age 10-50 years old, asexual *P falciparum* > 1000/ μ l blood, not pregnant women, not having complication of malaria, willing to be observed for 28 days and agree to take part in study by signing an informed consent.

The 32 samples were collected at day 2, and 10 samples were collected at 0, 2, 7, 14, 21, 28 days to detect the presence of paracymia and chloroquine and desethylchloroquine levels. A high Performance Liquid Chromatograph (HPLC) was used to analyze blood chloroquine and desethylchloroquine levels.

The result show that chloroquine has been regularly used (in 78.12% of subject) the day before the treatment was started. Mean blood redundant chloroquine and desethylchloroquine (combined) redundant in day 2 were 397.7 (SEM: 38.1) and percentage of paracymia inhibitory effect was 93.7% (SEM: 2.07). This study observed no significant correlations between blood chloroquine and desethylchloroquine levels and paracymia.

The result showed that increasing and decreasing of blood level chloroquine and desethylchloroquine has no correlation to the increasing or decreasing of paracymia inhibition in patients with *Plasmodium falciparum* infection in the endemic areas, which might be due to many factors including resistance to chloroquine.

Key words : chloroquine, desethylchloroquine – *P falciparum*

Pendahuluan

Berbagai upaya pemberantasan malaria telah dilakukan, tetapi prevalensi masih tetap tinggi. Salah satu kendala yang sering dijumpai dalam program pemberantasan malaria adalah adanya kegagalan terapi.

Penderita dinyatakan mengalami kegagalan terapi apabila sudah diobati dengan obat anti malaria tetapi masih menunjukkan gejala klinis malaria dan ditemukan *plasmodium* dalam darah tepi selama masa *follow up*. Hal ini disebabkan karena dosis tidak adekuat, respon seseorang yang buruk terhadap pengobatan, pasien tidak patuh terhadap regimen yang telah ditentukan atau sebagian besar obat hilang karena muntah (Bruce-Chwatt, 1980).

Penggunaan obat-obat yang terdaftar sebagai anti malaria sudah diatur dan dibakukan oleh Departemen kesehatan sesuai dengan daerah dan sensitifitas *P. falciparum* terhadap obat-obat anti malaria yang berguna menekan perkembangan kasus resistensi (Tjitra, 1997). Namun program pemberantasan malaria yang sejak lama menggunakan klorokuin sebagai obat anti malaria menyebabkan klorokuin telah dikenal masyarakat sebagai obat anti malaria, sering digunakan, mudah didapat, dan bisa dibeli di warung-warung/toko-toko kecil. Keadaan ini memungkinkan penggunaan klorokuin dalam waktu yang lama, berulang-

ulang dan dengan dosis yang tidak tepat/dosis parsial (Achmad and Sutanto, 1999) dan penggunaan obat secara tidak rasional akan menimbulkan kegagalan terapi dan resistensi.

Kegagalan terapi klorokuin telah dilaporkan di berbagai daerah di Indonesia, kegagalan terapi tersebut dimungkinkan akibat dari dosis yang tidak adekuat atau sudah terjadi resistensi dari parasit malaria terhadap klorokuin atau kedua-duanya (Tjokrosonto, 1990).

Penelitian ini dilakukan untuk melihat hubungan kadar klorokuin dengan parasitemia pada penderita malaria *falciparum* dan mengetahui apakah kegagalan terapi malaria yang diterapi dengan klorokuin dosis standar disebabkan oleh kadar klorokuin dan metabolit desetilklorokuin dalam darah yang tidak adekuat.

Metodologi

Subjek penelitian

Sejumlah 32 sukarelawan penderita malaria *falciparum*, umur 10-50 th, bersedia berpartisipasi dalam penelitian. Kriteria Inklusi: sediaan darah hanya *P.falciparum*, tidak sedang hamil/sakit berat, kepadatan parasit 1000-15.000 per mm³, gejala klinis tidak berat, keadaan umum baik, tidak minum klorokuin 14 hari terakhir, kina, tetrasiklin, fansidar 4 mgg terakhir, meflokuin 6 minggu terakhir, skrining Dill & Glazko (-). Kriteria eksklusi:

Penderita malaria berat, kepadatan parasit >250.000 per mm³.

Bahan

Klorokuin 150mg (Produksi PT Kimia Farma). Pemeriksaan darah tebal: giemsa, buffer tablet, aquabidest. Analisis kadar (metode Patchen,*et al*): IPA internal standar, MTBE, hexane, methanol, ether, NaOH, HCL, kertas saring (Whatman 1), Skrining kualitatif adanya klorokuin dalam urin, menggunakan reagen Dill & Glazko.

Alat

Timbangan badan, haemometer, termometer, pipet tetes, slide, mikroskop, vortex, pipet Pasteur, sentrifus, *glas-col*, HPLC dengan kolom Dupont Zorbax Sil diameter partikel 5-6µm; 25cm x 4,6mm.

Cara Penelitian

Sebanyak 32 subyek diterapi klorokuin hari pertama dan kedua 10mg/kgbb, hari ketiga 5mg/kgbb secara oral difollow-up suhu dan gejala klinik lain sampai dengan 29 hari. Diamati pemberian klorokuin dan parasitemia pada H0, H2, H28/*H recrudescence*, Subyek diambil cuplikan darah (100µl diteteskan di kertas saring) 3 kali (H0, H2, H28/HR) untuk dilakukan analisis kadar klorokuin dan metabolit desetilklorokuin dan diamati parasitemianya 3 kali pada H0, H2, H28/HR.

Sepuluh subyek yang diterapi klorokuin diambil cuplikan darah (100µl diteteskan di kertas saring) untuk melihat kadar klorokuin dan desetilklorokuin dalam darah serta diamati parasitemianya 6 kali (H0, H2, H7, H14, H21, H28) untuk melihat hubungan kadar klorokuin dan metabolit desetilklorokuin dalam darah dengan parasitemia.

a. Analisis Kadar Klorokuin (Metode Patchen *et al*, 1983)

Kertas saring berisi sampel, ditambahkan 50µl larutan IPA internal standar (1,02ng/µl dalam 0,002M asam hidroklorid), kertas dipotong-potong, tempatkan diatas vial, ditambahkan 3ml dari 0,2M asam hidroklorik kemudian divortex, diamkan selama 6 jam saring dengan glasswool di dalam pipet Pasteur kemudian ditambahkan 3,5 ml larutan MTBE-hexane (1:1) dan 0,5ml dari 5,0M sodium hidroklorid lalu diputar dengan *glas-col* selama 15 menit (30 kali/menit). Sentrifus 15 mnt (1500rpm), diambil surfactannya. Pelarut diuapkan, tambahkan 100µl *mobilphase* (ether-hexane-methanol), diambil 30 µl larutan suntikan ke HPLC.

b. Analisis Jumlah trofosoit

Sampel darah dibuat sediana apus darah tebal, diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Diperiksa dengan mikroskop menggunakan minyak emersi,

lensa obyektif 100 kali dan okuler 5 kali. Parasitemia dihitung dari jumlah parasit aseksual dalam 200 leukosit dimana diperkirakan terdapat 8.000 leukosit per satu mikroliter darah.

c. Analisis Data

Uji korelasi non parametrik metode Spearman dilakukan untuk melihat hubungan kadar klorokuin dan desetilklorokuin dengan parasitemia.

Hasil Dan Pembahasan

Dari pemeriksaan kadar klorokuin dan desetilklorokuin dalam darah pada pasien malaria yang memenuhi kriteria inklusi, didapatkan data sebagai berikut:

Pada Tabel I terlihat bahwa pada H0, walaupun belum minum obat tetapi pada sebagian besar subyek menunjukkan terdapat sejumlah klorokuin dalam darah, yaitu 25 subyek (78,13%) dengan kadar antara 10ng/ml-225ng/ml dan hanya 7 subyek (21,87%) yang di dalam darahnya tidak terdapat klorokuin. Kadar desetilklorokuin juga tampak pada H0, yaitu pada 14 subyek dengan kadar desetilklorokuin antara 10ng/ml-60ng/ml. Hal ini menunjukkan bahwa klorokuin telah digunakan secara luas dan bebas di masyarakat, sehingga merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya resistensi. Pada H2 kadar klorokuin dari 32 subyek antara 60ng/ml-924ng/ml dan kadar desetilklorokuin antara 40ng/ml-453ng/ml. Dari 18 subyek yang mengalami *recrudescence* (kekambuhan), didapatkan 10 subyek (56%) kadar CQ+DCQ < 200ng/ml dan 8 subyek (44%) kadar CQ+DCQ > 200ng/ml. Menurut Baird *et al* (1997), konsentrasi klorokuin + metabolit desetilklorokuin dalam darah lebih dari 200 ng/ml merupakan kadar minimal yang memberikan efek terhadap infeksi *P. falciparum*. Dengan demikian pada 44% subyek, kegagalan terapi tidak disebabkan oleh tidak adekuatnya kadar klorokuin dalam darah.

Pada penelitian ini hasil tes urin Dill&Glazko yang dilakukan untuk skrining adanya klorokuin dalam urin secara kualitatif didapatkan hasil yang negatif, tetapi setelah dilakukan pemeriksaan kadar klorokuin dalam darah menggunakan metode Patchen dengan alat HPLC didapatkan klorokuin dalam darah. Hasil penelitian Leksana, 1994 menunjukkan bahwa tes Dill&Glazko positif pada kadar minimal 75 µg/ml. Sehingga pemeriksaan Dill

Tabel I. Hasil pemeriksaan kadar klorokuin dan desetilklorokuin dalam darah pada H0, H2, dan HR (*recrudescence*) atau H28

No	Subyek	CQ(ng/ml)			DCQ(ng/ml)		
		H0	H2	H28/HR	H0	H2	H28/HR
1	K-001	0	322	128(H14)	0	207	14
2	K-002	150	242	176(H14)	0	172	58
3	K-003	20	570	142	60	453	52
4	K-004	60	284	112(H25)	0	182	48
5	K-005	225	307	80 (H14)	0	161	36
6	K-006	0	196	101(H14)	0	84	88
7	K-007	0	125	56(H28)	0	50	20
8	K-008	215	272	58	10	116	0
9	K-009	175	160	148(H7)	0	55	53
10	K-010	15	176	122(H21)	0	78	60
11	K-011	150	221	217(H14)	10	146	114
12	K-012	20	170	85(H7)	10	87	0
13	K-013	0	329	133(H21)	0	96	80
14	K-014	15	315	84	35	121	28
15	K-015	10	335	139(H7)	10	190	62
16	K-016	10	200	87	0	98	63
17	K-017	15	347	110(H28)	0	164	12
18	K-018	0	220	66(H21)	0	92	24
19	K-019	65	487	121	10	80	0
20	K-020	0	479	405(H7)	0	118	170
21	K-021	10	942	79	10	146	10
22	K-022	15	296	59	10	108	0
23	K-023	0	60	100(H7)	0	0	39
24	K-024	20	253	68	10	177	29
25	K-025	10	107	138	10	60	29
26	K-026	75	239	21	15	99	0
27	K-027	106	147	56	0	62	29
28	K-028	171	390	162	26	80	0
29	K-029	87	245	146	0	65	23
30	K-030	138	83	196(H7)	0	93	126
31	K-031	73	170	50	35	35	0
32	K-032	105	415	148(H7)	0	141	54
	Mean	61	284	118	8	119	41
	SEM	12,3	29,8	12,22	2,4	13,8	716

CQ= klorokuin, DCQ=desetilklorokuin, H0= Hari pertama sebelum minum obat, H2=hari ke-3, H28= hari ke-29, HR/H Recrudescence = hari terjadi kekambuhan sebelum hari ke 29.

& Glazko pada skrining tidak dapat mendekripsi klorokuin pada kadar yang lebih rendah dibandingkan dengan pemeriksaan menggunakan alat HPLC.

Dari pemeriksaan kadar klorokuin dan desetilklorokuin dalam darah dan prosentase penghambatan parasitemia pada H2 (hari ke-3) didapatkan data sebagai berikut (Tabel II).

Tabel II. Hubungan kadar klorouin dan desetilklorokuin dalam darah pada H2 dengan prosentase penghambatan parasitemia pada H2

No	Subyek	Kadar H2 (ng/ml)			% penghambatan parasitemia H2
		CQ	DCQ	CQ+DCQ	
1	K-001	322	207	529	100
2	K-002	242	172	414	69,47
3	K-003	570	453	1023	73,09
4	K-004	284	182	466	100
5	K-005	307	161	468	92,56
6	K-006	196	84	280	90,76
7	K-007	125	50	175	77,5
8	K-008	272	116	388	100
9	K-009	160	55	215	100
10	K-010	176	78	254	100
11	K-011	221	146	367	100
12	K-012	170	87	257	95,22
13	K-013	329	96	425	100
14	K-014	315	1421	436	100
15	K-015	335	190	525	52,11
16	K-016	200	98	296	81,26
17	K-017	347	164	511	100
18	K-018	220	92	312	76,92
19	K-019	487	80	567	98,54
20	K-020	479	118	403	94,90
21	K-021	942	146	1088	100
22	K-022	296	108	404	100
23	K-023	60	0	60	100
24	K-024	253	177	430	96,58
25	K-025	107	60	167	100
26	K-026	239	99	338	100
27	K-027	147	62	209	100
28	K-028	390	80	470	100
29	K-029	245	65	310	98,61
30	K-030	83	93	176	100
31	K-031	170	35	205	100
32	K-032	415	141	556	100
Mean		284	119	397,7	93,7
SEM		29,8	13,8	38,1	2,07

CQ=klorokuin,DCQ=desetilklorokuin, H2=hari ke-3

Tabel II menunjukkan bahwa pada H2 (hari ke-3) hampir semua subyek kadar CQ+DCQ lebih dari 200 ng/ml yaitu 28 subyek (87,5%) sedangkan 4 subyek (12,5%) kadar CQ+DCQ kurang dari 200ng/ml.

Dari 28 subyek yang mempunyai kadar klorokuin + desetilklorokuin > 200 ng/ml hanya 15 subyek (53,57%) didapatkan prosentase penghambatan parasitemia H2 100%, sedangkan 13 subyek (46,43%) dengan prosen-

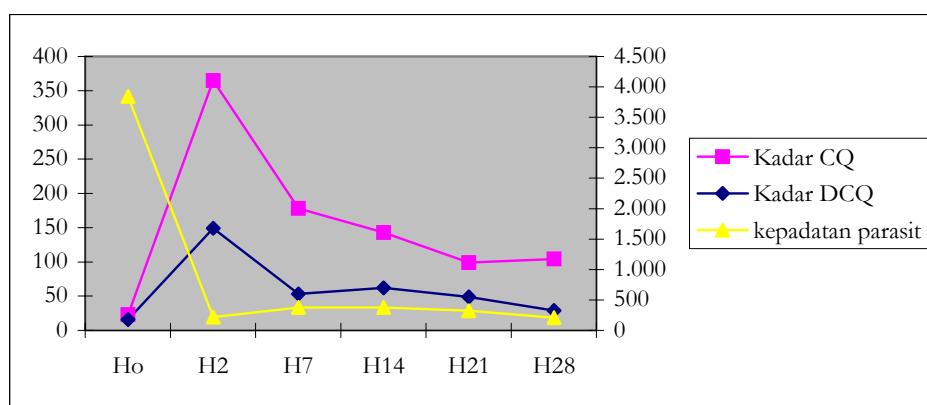
Tabel III. Kadar klorokuin + desetilklorokuin, kepadatan parasit pada H0, H2, H7,H14,H21,H28.

Subyek	Kadar CQ+DCQ (ng/ml)					Kepadatan Parasit (Parasitemia)						
	H0	H2	H7	H14	H21	H28	H0	H2	H7	H14	H21	H28
K-003	80,0	1023,0	488,0	239,0	535,0	194,0	1040,0	280,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K-014	50,0	436,0	163,0	213,0	111,0	136,0	1870,0	0,0	0,0	160,0	0,0	0,0
K-021	20,0	1088,0	155,0	215,0	42,0	79,0	1034,0	240,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K-022	25,0	404,0	88,0	112,0	48,0	59,0	1154,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K-025	20,0	167,0	308,0	92,0	119,0	167,0	1069,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K-011	160,0	367,0	114,0	342,0	0,0	323,0	2270,0	0,0	0,0	1104,0	0,0	0,0
K-013	0,0	425,0	260,0	212,0	152,0	23,0	10945,0	0,0	0,0	0,0	80,0	239,0
K-015	20,0	525,0	195,0	240,0	132,0	82,0	1000,0	1521,0	1980,0	120,0	197,0	453,0
K-020	10,0	587,0	405,0	542,0	144,0	140,0	3040,0	155,0	360,0	0,0	0,0	788,0
K-023	10,0	120,0	139,0	61,0	31,0	50,0	14493,0	0,0	1408,0	2392,0	2913,0	583,0
Mean	39,0	514,0	231,0	226,0	13,0	125,0	3841,0	219,0	374,0	377,0	319,0	206,0
SEM	15,2	100,0	41,8	43,7	47,8	27,9	1521,0	148,7	226,7	248,4	288,9	94,0

CQ=klorokuin,DCQ=desetilklorokuin, H0=Hari pertama sebelum minum obat, H2=hari ke-3, H7=hari ke-8, H14= Hari ke-15, H21=hari ke 22, H28= hari ke-29, HR/H Recrudescence = hari terjadi kekambuhan sebelum hari ke 29.

Tabel IV. Hubungan kadar klorokuin + desetilklorokuin dengan parasitemia secara statistik.

Kadar CQ + DCQ	Parasitemia	r	p
H2	H0-H2	-0,527	0,117
H7	H2-H7	0,175	0,63
H14	H7-H14	0,33	0,325
H21	H14-H21	-0,265	0,459
H28	H21-H28	-0,034	0,925



Gambar 1. Hubungan kadar klorokuin + metabolit desetilklorokuin dalam darah dengan parasitemia pada H0,H2, H7, H14, H21, H28.

tase penghambatan H₂<100%. Dari analisis statistik hubungan kadar klorokuin pada H₂ dengan prosentase penghambatan parasitemia H₂ pada 32 subyek tidak menunjukkan hubungan yang bermakna, sehingga peningkatan maupun penurunan kadar klorokuin pada H₂ tidak meningkatkan maupun menurunkan prosentase penghambatan parasitemia H₂.

Untuk melihat hubungan antara kadar klorokuin + desetilklorokuin dengan parasitemia pada H₀, H₂, H₇, H₁₄, H₂₁, H₂₈ dilakukan pemeriksaan kadar dan parasitemia pada 10 subyek.

Tidak terdapat hubungan yang bermakna antara kadar klorokuin + metabolit desetilklorokuin dalam darah yang dihubungkan dengan penghambatan parasitemia pada H₀, H₂, H₇, H₁₄, H₂₁, H₂₈, hal ini memperkuat

anggapan bahwa telah terjadi resistensi klorokuin terhadap *P. falciparum*.

Kesimpulan

Pada hasil penelitian ini peningkatan maupun penurunan kadar klorokuin pada infeksi *P.falciparum* di daerah endemik malaria tidak meningkatkan maupun menurunkan hambatan parasitemia, hal ini memperkuat dugaan bahwa pada subyek telah terjadi resistensi.

Ucapan Terima Kasih

Rasa terima kasih sebesar-besarnya atas fasilitas yang diberikan oleh Dr. Kevin Baird dari Departemen Parasitologi NAMRU II Jakarta dan Kepala Puskesmas Pituruh I, dr. Lusiana M.Kes beserta staf atas segala saran dan bantuan dalam pengambilan sampel penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Achmad, M.F., and Sutanto, I., 1999, Resistensi *Plasmodium vivax* terhadap klorokuin serta strategi penanganannya, *Majalah Kedokteran Indonesia*, 49(1):11-14
- Baird, J.K., Jones, Fryauff, M., Sutanihardja, A., Leksana, B., Widjaya, H., Kis darmanto., and Subianto, B., 1997, In Vivo Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* at nabire, Irian Jaya, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyd. Hyg* 56 (6), 627-631.
- Bruce-Chwatt, L.J., 1980, *Essential Malariaiology*, William Heinemann Medical Books Ltd, London, 20-23
- Leksana, B., 1994, *Dill & Glazko test*. NAMRU-2, Tidak dipublikasikan.
- Patchen L.C., Mount D.L., Schwartz I.K., and Churchill F.C., 1983, Analysis of-filkter paper absorbed, finger stick blood samples for chloroquine and its major metabolite using High Performance Chromatography with fluorescence detection. *J.Chromatogr* 278 : 81-89.
- Tjitra, E, 1997, Tinjauan Hasil Uji Coba Pengobatan dan Pencegahan Malaria di Beberapa Tempat di Indonesia 1986-1995, *Buletin Penelitian kesehatan*, 25:1-21.
- Tjokrosonto, S., 1990, Resistensi terhadap Obat antimalaria, *Berita kedokteran Masyarakat*, 99:5-23.