

PERKEMBANGAN KAEDAH PRA-KLINIKAL ASID ARTESUNIK,
SATU TERBITAN ARTEMISININ YANG BARU

oleh

KATHIRESAN A/L V.SATHASIVAM

Tesis diserahkan untuk memenuhi
sebahagian keperluan bagi
Ijazah Sarjana Sains

April 2002

Penerbitan

1. Olliaro PL, Nair NK, Sathasivam K, Mansor SM, Navaratnam V. Pharmacokinetics of Artesunate after single oral administration to rats. *BioMedCentral Pharmacology*. 2001;1(1):12.
2. Stability kinetics of Artesunic Acid in aqueous solutions and biological fluids. (*Di dalam persediaan*)
3. K.Sathasivam, S.Ramanathan, S.M.Mansor, N.K.Nair and V.Navaratnam. Stability of Artesunate in aqueous solutions of physiological significance. 3rd, MOH-AMM Scientific Meeting (1-4 Nov 2000) Kuala Lumpur (an abstract).
4. K.Sathasivam, S.Ramanathan, S.M.Mansor, N.K.Nair, P.L. Olliaro and V.Navaratnam. Development of a new procedure for dissolution profiles of Artesunate suppository. 3rd, MOH-AMM Scientific Meeting (1-4 Nov 2000) Kuala Lumpur (an abstract).
5. K.Sathasivam, R.H.Mas, S.Ramanathan, S.M.Mansor, N.K.Nair, P.L. Olliaro and V.Navaratnam. Pre-clinical method development of Artesunate, a new derivative of Artemisinin, First Regional Conference on Inorganic Chemistry, RECIC 2000 (14-15 Nov 2000) USM, Penang (an abstract)

PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Institut Pengajian Siswazah, USM atas bantuan siswazah pembantu yang diberikan kepada saya selama satu tahun. Saya juga ingin merakamkan setinggi-tinggi terima kasih kepada Prof. Madya Dr. Sharif Mahsufi Mansor, Pengarah Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubat-Ubatan atas kemudahan makmal dan sokongan. Saya juga ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan ribuan terima kasih dan penghargaan kepada penyelia utama saya, Prof.(Dr).V.Navaratnam. Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada penyelia-penyelia bersama saya, Prof.N.K.Nair dan Prof. Madya Dr. Sharif Mahsufi Mansor atas sokongan, bimbingan, nasihat serta pedoman mereka sepanjang penyelidikan ini dijalankan. Penghargaan juga ingin disampaikan kepada Dr.Surash Ramanathan yang sentiasa memberi sokongan dan tunjuk ajar. Ucapan terima kasih juga saya tujukan kepada En.Asokan, En.Arunachalam, En.Zamri dan En.Zulkefli serta pembantu-pembantu makmal yang lain. Penghargaan juga tidak dilupakan kepada pegawai-pegawai penyelidik serta rakan-rakan ijazah lanjutan yang lain dari Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubat-Ubatan atas bantuan teknikal dan dorongan. Sesungguhnya kehadiran mereka mencerikan lagi suasana penyelidikan di Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubat-Ubatan. Akhir sekali, ucapan ribuan terima kasih kepada keluarga saya yang sentiasa mendoakan kejayaan saya.

JADUAL KANDUNGAN

	muka surat
PENERBITAN	iii
PENGHARGAAN	iv
JADUAL KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI LAMBANG, KEPENDEKAN DAN TATANAMA	xiv
Abstract	xv
Abstrak	xviii
BAB 1 : PENGENALAN DAN TUJUAN KAJIAN	1
1.1 Malaria	1
1.2 Status malaria di Malaysia	2
1.3 Patalogi dan kemoterapi malaria	5
1.3.1 Kitar hidup malaria	5
1.3.2 Pemiakan parasit dalam badan manusia	6
1.3.3 Jangkitan semula dan jangkitan berbalik	8
1.3.4 Pengkelasan drug antimalaria	8
1.3.5 Vaksin malaria	10
1.4 Rintangan drug	11
1.5 Status agen-agen antimalaria yang baru	13
1.6 Artemisinin dan terbitan-terbitannya	14
1.7 Asid Artesunik	15
1.7.1 Pengenalan	15
1.7.2 Sifat-sifat kimia	17
1.7.3 Aktiviti antimalaria	17
1.7.4 Farmakokinetik	19
1.8 Dihidroartemisinin	21

1.8.1 Sifat-sifat kimia	21
1.8.2 Aktiviti antimalaria	21
1.8.3 Farmakokinetik	22
1.9 Pengenalan pelarutan	23
1.9.1 Latarbelakang	23
1.9.2 Klasifikasi sistem biofarmaseutik	24
1.9.3 Penetapan spesifikasi pelarutan	25
1.9.4 Kaedah-kaedah untuk menetapkan pelarutan untuk produk drug baru	27
1.9.5 Kaedah penetapan spesifikasi pelarutan produk generik	28
1.9.6 Korelasi <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i>	28
1.9.7 Panduan pengawasan kualiti	29
1.10 Syarat-syarat penetapan pelarutan	29
1.10.1 Peralatan	29
1.10.2 Media pelarutan	32
1.10.3 Penggunaan surfaktan	32
1.10.4 Kelajuan putaran	33
1.10.5 Kaedah analisis	33
1.11 Analisis kinetik	34
1.11.1 Pengenalan	34
1.11.2 Penilaian-penilaian secara teori	34
1.11.3 Tertib tindakbalas	35
1.11.4 Tindakbalas tertib sifar	35
1.11.5 Tindakbalas tertib pertama	37
1.11.6 Tindakbalas tertib pertama pseudo	39
1.11.7 Pengaruh pH ke atas penguraian	40
1.11.8 Pengaruh suhu terhadap penguraian	41
1.12 Penguraian asid-bes secara am	44
1.12.1 Mekanisme penguraian	44
1.12.2 Hidrolisis	44
1.12.3 Hidrolisis ester	45
1.12.4 Hidrolisis amida	45
1.13 Parameter farmakokinetik	47
1.13.1 Masa separuh hayat penyingkiran	47
1.13.2 Klearens	48
1.13.3 Isipadu taburan	49
1.13.4 Kepekatan maksimum dan masa maksimum	50
1.13.5 Penyerapan	50
1.14 Tujuan kajian	51

BAB 2 : KAEDAH PENYELIDIKAN DAN BAHAN	53
2.1 Bahan, peralatan dan larutan piawai	53
2.1.1 Bahan-bahan kimia	53
2.1.2 Bahan-bahan piawai	54
2.1.3 Peralatan	54
2.1.4 Penyediaan larutan piawai	55
2.1.5 Pensilanaan	56
2.2 Sifat-sifat fizikokimia	56
2.3 Prosedur untuk penentuan sifat-sifat fizikokimia	56
2.3.1 Ciri-ciri fizikal	56
2.3.2 Takat lebur	56
2.3.3 Spektrum penyerapan ultralembayung	56
2.3.4 Spektrum inframerah	57
2.3.5 Spektrum ¹ H resonans magnetik nuklear	57
2.3.6 Penentuan ketulenan	57
2.3.7 Penentuan sebatian berkaitan	58
2.3.8 Pembentukan kaedah	58
2.3.9 Kaedah pengesanan	59
2.3.10 Had pengesanan minima	59
2.3.11 Keterlarutan	61
2.4 Kaedah analisis	60
2.4.1 Kromatografi	60
2.4.2 Pengekstrakan dan penyediaan sampel	61
2.5 Prosedur untuk perkembangan kaedah pelarutan suppositori ARS	63
2.5.1 Suhu media	63
2.5.2 Isipadu media	63
2.5.3 Larutan penimbal	63
2.5.4 Pemilihan radas	63
2.5.5 Pengubahsuaian radas	63
2.5.6 Kuantiti surfaktan	64
2.5.7 Kelajuan putaran	64
2.5.8 Perbandingan kaedah dayung dan kaedah bakul	65
2.5.9 Kaedah analisis	65
2.6 Kajian kinetik ARS di dalam larutan penimbal dan media biologi	65
2.6.1 Kajian kinetik menggunakan sampel bahan mentah ARS	66
2.6.1.1 Penyediaan larutan penimbal	66
2.6.1.2 Penyediaan larutan kajian	67
2.6.1.3 Kaedah analisis	67

2.6.1.4	Penentuan kadar tindakbalas	68
2.6.1.5	Kajian penguraian ARS	68
2.6.1.6	Pengaruh kepekatan ARS	68
2.6.1.7	Kajian pengaruh pH ke atas kadar tindakbalas (k_{obs})	69
2.6.1.8	Kajian keluk Arrhenius	69
2.6.2	Kajian kinetik ARS di dalam media biologi	70
2.6.2.1	Kaedah pengekstrakan dan penyediaan sampel	70
2.6.2.2	Kajian kinetik di dalam plasma	70
2.6.2.3	Kajian kinetik di dalam darah	71
2.6.2.4	Kajian perencatan ARS di dalam plasma	72
2.7	Kajian farmakokinetik di dalam tikus	73
2.7.1	Haiwan	73
2.7.2	Pemberian drug	73
2.7.3	Pensampelan darah	74
2.7.4	Analisis data	74
BAB 3	: KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	75
3.1	Kajian fizikokimia dan ketulen	75
3.1.1	Ciri-ciri kimia	75
3.1.2	Takat lebur	75
3.1.3	Spektrum penyerapan ultralembayung	75
3.1.4	Spektrum inframerah	77
3.1.5	Spektrum resonan magnetik nuklear	81
3.1.6	Penentuan ketulen	81
3.1.7	Penentuan sebatian berkaitan	87
3.1.7.1	Penentuan nilai R_f yang sesuai	87
3.1.7.2	Had pengesanan minimum	88
3.1.7.3	Penentuan sebatian berkaitan	88
3.18	Keterlarutan	89
3.19	Kesimpulan	90
3.2	Perkembangan kaedah pelarutan suppositori asid artesunik	91
3.2.1	Pemilihan radas	91
3.2.2	Pengubahsuaian radas	93
3.2.3	Kuantiti surfaktan	97
3.2.4	Kelajuan putaran	101
3.2.5	Perbandingan kaedah dayung dan kaedah bakul	101
3.2.6	Perbincangan	106
3.3	Kajian kinetik pada larutan penimbal dan media biologi	111
3.3.1	Produk-produk penguraian	111
3.3.2	Penentuan kadar tindakbalas	116
3.3.3	Pengaruh kepekatan ARS	116

3.3.4 Profil kadar – pH	123
3.3.5 Pergantungan terhadap suhu	125
3.3.6 Kajian kinetik di dalam plasma	128
3.3.7 Kajian perencanaan ARS di dalam plasma	131
3.3.8 Kajian kinetik di dalam darah	131
3.3.9 Kesimpulan kajian kinetik	134
3.4 Kajian farmakokinetik di dalam tikus	138
3.5 Kesimpulan	144
Bibliografi	149

SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
1.1	Panduan pengawasan kualiti tablet atau kapsul sesuatu drug	30
3.1	Nombor gelombang beberapa kawasan jalur spektrum IR bagi ARS	78
3.2	Nombor gelombang beberapa kawasan jalur spektrum IR bagi DHA	78
3.3	Peratus ketulenan sampel-sampel ARS	84
3.4	Peratus ketulenan sampel-sampel DHA	85
3.5	Komposisi fasa gerak dan nilai Rf bagi ARS, DHA dan artemisinin	87
3.6	Had pengesanan minima ARS, DHA dan artemisinin di atas plat Kromatografi Lapisan Nipis	88
3.7	Peratus kepekatan sebatian-sebatian berkaitan di dalam sampel ARS dan DHA	89
3.8	Perbandingan peratus pembebasan 200mg suppositori ARS menggunakan kaedah bakul dan kaedah dayung tanpa pengubahsuaian (n=2)	91
3.9	Peratus pembebasan ARS dengan pengubahsuaian pertama	94
3.10	Peratus pembebasan ARS dengan pengubahsuaian kedua	95
3.11	Perbandingan di antara profil pelarutan suppositori menggunakan kepekatan SDS yang berbeza	99
3.12	Peratus pembebasan drug pada 3 kelajuan berbeza. (Kaedah dayung yang diubahsuai dan 0.05% SDS telah digunakan)	102
3.13	Profil pembebasan drug membandingkan kaedah bakul dan kaedah dayung	104
3.14	Peratus pembebasan 6 suppositori menggunakan kaedah dayung dengan pengubahsuaian, kelajuan putaran 100kpm dan 0.05% surfaktan	109
3.15	Nilai-nilai kepekatan min dan sisihan piawai bagi setiap larutan penimbang yang dikaji.	117

3.16	Nilai-nilai kadar tindakbalas (k), separuh hayat ($t_{1/2}$) dan pekali regerasi (r) bagi kajian kinetik pada kepekatan berbeza. (pH 1.2, $\mu=0.5$ dan suhu 37°C)	122
3.17	Nilai-nilai kadar tindakbalas (k), separuh hayat ($t_{1/2}$) dan pekali regerasi (r) bagi kajian kinetik pada pH yang berbeza, ($\mu=0.5$ dan suhu 37°C).	124
3.18	Kesan suhu terhadap penguraian ARS di dalam penimbal (pH 1.2 dan pH 7.4, $\mu=0.5$)	129
3.19	Nilai-nilai kepekatan ARS dan DHA selepas kajian kinetik di dalam plasma	130
3.20	Kesan perencat fenilmetilsulfonil flourida (PMSF) terhadap enzim asetokolinaesterase di dalam plasma	132
3.21	Nilai-nilai kepekatan ARS dan DHA selepas kajian kinetik di dalam darah	133
3.22	Nilai-nilai pemalar kadar dan nilai separuh hayat ($t_{1/2}$) bagi larutan-larutan penimbal (pH 1.2 dan pH 7.4), plasma dan darah.	137
3.23	Kepekatan plasma (ng/ml) ARS di dalam tikus selepas diberi 150mg/kg secara oral	140
3.24	Kepekatan plasma (ng/ml) DHA di dalam tikus selepas diberi 150mg/kg secara oral	141

SENARAI RAJAH

Rajah		muka surat
1.1	Kitar hidup parasit malaria dan kawasan-kawasan tindakan drug antimalaria	7
1.2	Struktur drug antimalaria terbitan Artemisinin	16
1.3	Sintesis asid artesunik daripada Artemisinin	18
1.4	Keluk penguraian drug menurut tindakbalas tertib pertama	38
1.5	Keluk kadar tindakbalas melawan pH menunjukkan kestabilan maksimum	41
1.6	Pergantungan suhu terhadap kadar tindakbalas	43
1.7	Hidrolisis ester secara am	46
2.1	Kromatogram tipikal untuk a) campuran piawai ARS (100ng), DHA (100ng) dan piawai dalaman (1000ng), b) plasma yang didapati daripada sukarelawan selepas pemberian 200mg ARS secara oral dan c) kromatogram plasma kawalan (tanpa drug).	62
3.1	Spektrum tipikal ultralembayung ARS	76
3.2	Spektrum tipikal ultralembayung DHA	76
3.3	Spektrum tipikal inframerah ARS	79
3.4	Spektrum tipikal inframerah DHA	80
3.5	Spektrum tipikal nuklear magnetik resonans ARS	82
3.6	Spektrum tipikal nuklear magnetik resonans DHA	83
3.7	Struktur isomer-isomer Dihidroartemisinin	86
3.8	Perbandingan di antara profil pelarutan menggunakan kaedah bakul dan kaedah dayung tanpa pengubahsuaian dengan kelajuan putaran sebanyak 100kpm bagi kedua-dua kaedah tersebut	92
3.9	Perbandingan di antara pengubahsuaian I dan II menggunakan kaedah dayung	96

3.10	Pengubahsuaian – pengubahsuaian kaedah dayung	97
3.11	Perbandingan profil dengan kepekatan SDS yang berbeza pada kelajuan 100kpm.	100
3.12	Perbandingan kaedah pelarutan menggunakan 3 kelajuan berbeza.	103
3.13	Perbandingan di antara kaedah bakul dan kaedah dayung dengan pengubahsuaian	105
3.14	Peratus pembebasan drug bagi 6 suppositori menggunakan kaedah yang diubahsuai, kelajuan putaran 100rpm dan 0.05% SDS	110
3.15	Kromatogram-kromatogram tipikal bagi tindakbalas ARS di dalam a) media asid pH 1.2, b) media neutral pH 7.4 dan media alkali, pH 10.0	112
3.16	Mekanisme proses hidrolisis ARS kepada DHA di dalam media asid	113
3.17	Spektrum penguraian ARS di dalam media alkali dan penyerapan sebatian penguraian pada jarak gelombang λ_{maks} =289nm dan 236nm.	115
3.18	Log kepekatan melawan masa bagi setiap pH yang dikaji.	120
3.19	Profil menunjukkan pergantungan terhadap kepekatan ARS pada pH 1.2, 37°C dan μ =0.5.	121
3.20	Profil log K_{obs} - pH bagi hidrolisis ARS di dalam larutan penimbal pada 37°C dan μ =0.5.	126
3.21	Graf menunjukkan pergantungan ARS terhadap suhu pada pH 1.2 dan pH 7.4	128
3.22	Kepekatan plasma ARS dan DHA di dalam tikus selepas diberi dos oral tunggal ARS sebanyak 150mg/kg	139

SENARAI LAMBANG, KEPENDEKAN DAN TATANAMA

%	- Peratus
°C	- darjah Celcius
λ_{maks}	- Panjang gelombang maksimum
ARS	- Asid artesunik
AUC	- Luas di bawah graf
AUC_{0-t}	- Luas di bawah graf dari masa 0 hingga t
BP	- British Pharmacopeia
C_{maks}	- Kepekatan maksimum
DHA	- Dihidroartemisinin
H^+	- Ion Hidrogen
HCl	- Asid hidroklorik
IC	- Kepekatan perencat
kpm	- Kisaran perminit
mg	- Miligram
mg/kg/hari	- Miligram perkilogram perhari
ml/L	- Mililiter perliter
ng/hr/ml	- Nanogram jam permililiter
nm	- Nanometer
nM	- Nano molar
nmol/L	- Nano mol per liter
PMSF	- Fenilmetil sulfonil florida
s^{-1}	- persaat
SDS	- Natrium dodesil sulfat
$t_{1/2}$	- Separuh hayat
$t_{1/2a}$	- Separuh hayat penyerapan
$t_{1/2z}$	- Separuh hayat penyingkiran
T_{maks}	- Masa yang diambil untuk mencapai kepekatan maksimum
USP	- United States Pharmacopeia

PRE-CLINICAL METHOD DEVELOPMENT OF ARTESUNIC ACID, A NEW DERIVATIVE OF ARTEMISININ

ABSTRACT

Artesunic acid, a derivative of artemisinin has proven to be rapidly effective and safe in the treatment of malaria. Artesunic acid has been formulated for parenteral and oral use and has recently become available as suppositories for rectal administration. Artesunic acid and its active metabolite, dihydroartemisinin used in all these studies was characterized using infrared and nuclear magnetic resonance. The purity was determined by high performance liquid chromatography coupled with an electrochemical detector. To date, there is no dissolution method available to determine the dissolution profile of artesunic acid from suppositories. This study describes a newly developed dissolution procedure for analysis of artesunic acid suppositories. *In vitro* dissolution profiles of artesunic acid from the suppositories were examined by means of basket (Apparatus I, USP XXII) and paddle (Apparatus II, USP XXII) methods. The dissolution profiles were also studied using a modified paddle method as the capsule floated after 2 hours in this method. The paddle method was then modified by using a stainless steel helix and mesh that were placed at the bottom of the vessel. In conclusion, the modified paddle method with 0.05% of sodium doedecyl sulphate as surfactant was adopted for artesunic acid suppository developmental studies. Next, a pre-clinical study was initiated to investigate the stability of artesunic acid in buffer solutions at pH 1.2 –10.0 and in biological fluids. Pre-clinical studies in buffers and biological fluids indicated that ARS was biotransformed to its active metabolite, dihydroartemisinin. The rate for the biotransformation of artesunic acid to dihydroartemisinin in biological media at 37°C was more rapid when compared to the rates

in buffer solutions with pH values similar to biological fluids. This result tends to suggest that acetolinesterase enzyme increases the biotransformation rate of artesunic acid to dihydroartemisinin. Pre-clinical studies in buffer solutions ranging from pH 8.5 – pH 10.0 indicated that artesunic acid is degraded into a new product (s) which absorbs at $\lambda_{\max} = 289\text{nm}$ and 236nm . Following an oral administration in rats, rapid absorption and extensive biotransformation artesunic acid to dihydroartemisinin was observed. The mean AUC_{0-t} and T_{\max} values of artesunic acid were 713.1 ± 233.3 nghr/ml and 5.0 ± 0.0 minutes respectively. The corresponding values of dihydroartemisinin were 2040.3 ± 650.0 nghr/ml and 37.5 ± 8.7 minutes. The calculated absorption $t_{1/2}$ mean was 2.73 ± 0.85 minutes for artesunic acid and 12.49 ± 2.49 minutes for dihydroartemisinin. The data from this study indicates that rapid conversion of artesunic acid to dihydroartemisinin occurs in the stomach.

ABSTRAK

Asid artesunik merupakan terbitan artemisinin yang berkesan dan selamat digunakan untuk merawat kes-kes malaria. Asid artesunik wujud dalam formulasi parenteral dan oral, kini dibentuk secara suppositori untuk pemberian secara rektal. Sehingga kini, masih tiada kaedah pelarutan secara rasmi bagi suppositori asid artesunik. Kaedah inframerah dan resonans magnetik nuklear telah digunakan untuk pencirian asid artesunik dan metabolit aktifnya, dihidroartemisinin.. Ketulenan sebatian-sebatian tersebut telah ditentukan menggunakan kromatografi cecair prestasi tinggi yang dilengkapi dengan pengesan elektrokimia. Memandangkan masih tiada kaedah pelarutan secara rasmi bagi suppositori asid artesunik, satu prosedur pelarutan bagi analisis suppositori ini telah dibentuk. Profil pelarutan *in vitro* suppositori asid artesunik telah dikaji menggunakan kaedah bakul (Radas I, USP XXII) dan kaedah dayung (Radas II, USP XXII). Profil pelarutan drug ini juga telah dikaji menggunakan kaedah dayung yang diubahsuai kerana suppositori asid artesunik terapung pada permukaan media selepas 2 jam. Pengubahsuaian yang dilakukan ialah lingkaran keluli tidak berkarat berbentuk helix dan jaring diletakkan pada dasar bikar pelarutan. Pada kesimpulannya, kaedah dayung yang diubahsuai dengan 0.05% natrium dodesil sulfat sebagai surfaktan telah digunakan untuk kajian suppositori asid artesunik. Seterusnya, kajian pra klinikal telah dijalankan untuk menyiasat kestabilan asid artesunik di dalam larutan penimbal di antara pH 1.2 – pH 10.0 dan media biologi. Keputusan kajian ini menunjukkan asid artesunik dihidrolisis kepada metabolit aktifnya, dihidroartemisinin di dalam larutan-larutan penimbal penimbal pH 1.2 – pH 7.4 dan media biologi. asid artesunik. Kadar penguraian asid artesunik kepada dihidroartemisinin di dalam media biologi pada suhu 37°C di dapati lebih pantas

berbanding dengan kadar penguraian di dalam larutan penimbal yang memiliki pH yang setara dengan media biologi. Keputusan kajian ini mencadangkan kehadiran enzim asetokolinaesterase membantu dalam mempercepatkan proses penguraian asid artesunik kepada dihidroartemisinin. Pada julat pH 8.5 – pH 10.0, asid artesunik terurai kepada produk yang memiliki panjang gelombang λ_{maks} 289nm dan 236nm. Penyerapan dan hidrolisis drug asid artesunik kepada dihidroartemisinin yang pantas telah diperhatikan selepas pemberian asid artesunik secara oral kepada tikus. Nilai min AUC_{0-t} dan T_{maks} asid artesunik ialah 713.1 ± 233.3 ngr/ml dan 5.0 ± 0.0 minit masing-masing. Nilai setara bagi dihidroartemisinin pula ialah 2040.3 ± 650.0 ngr/ml dan 37.5 ± 8.7 minit masing-masing. Data daripada kajian ini membuktikan asid artesunik dihidrolisis dengan pantas di dalam perut.

BAB 1

PENGENALAN DAN TUJUAN KAJIAN

1.1 Malaria

Malaria merupakan penyakit endemik yang serius di negara-negara tropika (Engers & Godal, 1998). Malaria juga merupakan penyakit bawaan vektor yang paling berbahaya di dunia (Murray & Lopez, 1997). Di dalam 10 tahun yang lalu, penyakit malaria telah meningkat secara mendadak, terutamanya di Afrika. Sehubungan dengan itu, Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) telah mengistiharkan 101 buah negara dan wilayah mempunyai masalah penyakit malaria. Kini malaria dilaporkan sebagai masalah kesihatan awam yang serius dan merangkumi 40% penduduk dunia (WHO, 1998). Prevalen kes-kes yang berkaitan dengan malaria setiap tahun dianggarkan di antara 300 hingga 500 juta kes di seluruh dunia yang mengakibatkan jumlah kematian di antara 1.5 hingga 2.7 juta orang. (WHO, 1996). Daripada jumlah kematian tersebut, 90% kes-kes malaria melibatkan kanak-kanak berusia kurang dari 5 tahun di Afrika (Marsh et al., 1995). Majoriti kematian di kalangan kanak-kanak berlaku di kawasan pedalaman yang selalunya adalah jauh dari kemudahan pusat-pusat kesihatan (WHO, 1998). Tambahan lagi, jangkitan *Plasmodium falciparum* merupakan parasit yang utama menyumbang kepada kadar kematian yang tinggi (Rosenthal, 1998).

Kini, kemunculan *Plasmodium* yang memiliki sifat rintangan terhadap kebanyakan agen-agen antimalaria mengakibatkan kewujudan semula malaria di negeri-negeri yang dahulunya bebas dari malaria. Kewujudan drug antimalaria secara tidak sekata adalah satu faktor yang menyebabkan rintangan terhadap drug berlaku dengan pantas (Landgraf et al., 1994; Wernsdorfer, 1992). Tambahan pula peperangan dan kacau bilau di kebanyakan

negara memaksa sejumlah penduduk berpindah ke kawasan yang mungkin merupakan kawasan jangkitan malaria (Nchinda,1998 ; Molyneux, 1998.) Di samping itu, perubahan persekitaran (Molyneux,1998) termasuk corak hujan, suhu dan ketinggian (Ekwanzala et al., 1996 ; Seamen et al., 1992) serta projek-projek pembinaan seperti pembentungan air dan skema pengaliran yang tidak cekap mewujudkan tapak pembiakan nyamuk (Hunter et al.,1993; Jewsbury & Imevbore,1988; Service,1989). Tambahan lagi, keadaan sosioekonomi yang buruk mengakibatkan peruntukkan belanjawan yang rendah untuk sektor kesihatan merumitkan lagi usaha-usaha untuk mengawal penyakit malaria (Nchinda, 1998 ; Molyneux, 1998.). Akhir sekali, perubahan dalam kelakuan vektor terutamanya dalam corak gigitan juga menyumbang kepada kemunculan semula malaria (Nchinda, 1998).

1.2 Status malaria di Malaysia

Malaria masih lagi merupakan masalah kesihatan awam yang utama di Malaysia, terutamanya di Sabah (Rahman, 1982; Mak et al.,1992; Rahman et al., 1997). Lantaran itu, Rancangan Pembasmian Malaria (Malaria Eradication Program) telah dilancarkan pada tahun 1961 di Sabah dan Sarawak. Tujuan program ini dilaksanakan ialah untuk membasmi penyakit malaria dan nyamuk. Pada tahun 1967, Rancangan Pembasmian Malaria telah dimulakan di Semenanjung Malaysia (Rahman, 1982). Walaupun pada mulanya malaria dapat dikawal, namun pembenterasan penyakit ini tidak dapat dilakukan dengan sepenuhnya. Justeru itu, pada 1981 konsep pembasmian telah ditukar pada konsep pengawalan. Ini telah mendorong pelaksanaan program berbentuk pengawalan melalui Rancangan Pengawalan Penyakit Bawaan Vektor (Vector Borne Disease Control Program). Tujuan utama program ini dilaksanakan ialah untuk mengurangkan kadar jangkitan malaria kepada 10 per 10,000 populasi di kawasan-kawasan endemik malaria. Di

samping itu program ini juga bertujuan untuk mengurangkan kejadian dan kematian akibat malaria dan memastikan agar malaria tidak menjadi masalah kesihatan utama di negara ini. Program ini secara umumnya boleh mencegah wabak malaria daripada memasuki kawasan-kawasan bebas malaria.

Sejak program ini dilaksanakan, bilangan kes-kes malaria yang dilaporkan menurun secara progresif (Rahman et al., 1997). Sebelum pelaksanaan program ini sebanyak 300,00 kes-kes malaria telah dianggarkan tetapi pada tahun 1989 hanya 65,283 kes-kes malaria dilaporkan di seluruh Malaysia (Rahman et al., 1997). Pada tahun 1991 pula, sejumlah 39,189 kes malaria telah dilaporkan dicatat di mana kadar kejadian malaria dicatat pada 2.2 per populasi (Mak et al., 1992). *Plasmodium falciparum* berterusan menjadi spesies utama yang menyumbang kepada 70% kes-kes malaria di Malaysia (Lim, 1992 ; Mak et al., 1992). *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* dan jangkitan bercampur pula menyumbangkan kepada 28%, 1% dan 1% masing-masing (Mak et al., 1992).

Di Malaysia, pencegahan jangkitan tertumpu kepada tiga golongan yang berisiko tinggi. Golongan-golongan tersebut ialah pelawat-pelawat luar negeri yang ingin ke kawasan pedalaman Malaysia, anggota-anggota tentera yang bertugas di kawasan pedalaman terutamanya di bahagian sempadan Malaysia-Negara Thai dan penduduk setempat yang bekerja di kawasan-kawasan hutan. Justeru itu, Kementerian Kesihatan Malaysia telah mensyorkan 3 peringkat pencegahan bagi golongan ini. Regim-regim yang disyorkan ialah

- i) Fansidar – 1 biji - seminggu sekali
 Klorokuina – 2 biji

Pengambilan ubat-ubatan rejim (i) mulai seminggu sebelum lawatan ke tempat yang bermasalah malaria dan diteruskan sehingga 4 minggu selepas pulang dari tempat tersebut.

- ii) Proguanil – sekali sehari
Klorokuina – sekali seminggu

- iii) Doksisiklina – sekali sehari

Pelawat-pelawat yang akan ke tempat yang telah dikenalpasti mempunyai masalah kekebalan malaria seperti Kemboja, Vietnam dan Negara Thai Utara akan diberikan rejim (iii). Rejim ini juga merupakan regim yang disyorkan oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia.

Rintangan terhadap klorokuina telah dilaporkan pada awal 1970an di Malaysia (Andre et al., 1972). Di samping itu, kajian-kajian klinikal telah melaporkan rintangan terhadap proguanil (Wilson et al., 1952), pirimetamina (Wilson & Edeson, 1953), fansidar (Mak et al., 1992; Tan & Tan, 1983) dan kuinina (Mak et al., 1992) adalah lazim ditemui di Malaysia. Namun begitu, jangkitan malaria di Malaysia di rawat menggunakan kombinasi kuinina dan tetrasiklina (Mak et al., 1992). Menurut *Garis Panduan Pengendalian Kes-kes Malaria (2000)* oleh Kementerian Kesihatan Malaysia, rawatan peringkat pertama masih lagi merupakan klorokuina. Rawatan peringkat kedua dan ketiga pula ialah primakuina dan kuinina sulfat masing-masing. Selain daripada itu, para penyelidik telah melaporkan meflokuina juga digunakan di Malaysia untuk mencegah dan merawat pesakit malaria. Keputusan kajian menggunakan meflokuina ke atas penghidap malaria bukan komplikasi menunjukkan para pesakit sembuh sepenuhnya apabila dirawat sepenuhnya dengan drug tersebut (Black et al., 1981). Di samping itu, pemberian meflokuina dan fansidar secara kombinasi memberikan perlindungan yang berkesan daripada penyakit malaria dengan kesan sampingan yang minima (Navaratnam et al., 1989). Kini 2 cubaan klinikal sedang giat dijalankan di Malaysia oleh Kementerian Kesihatann yang melibatkan drug artesunat. Ini adalah kerana parasit malaria mudah rintang terhadap drug-drug antimalaria yang sedang digunakan untuk rawatan malaria. Cubaan klinikal artesunat yang pertama

melibatkan pemberian drug secara oral ke atas kanak-kanak sihat dan sukarelawan. Cubaan klinikal yang kedua pula merupakan pemberian drug artesunat secara oral kepada subjek dewasa yang dijangkiti malaria bukan komplikasi. Keputusan-keputusan kajian ini adalah penting kerana ianya akan membantu dalam menentukan keberkesanaan artesunat jika dibandingkan dengan kuinina (Kementerian Kesihatan, data belum diterbitkan).

1.3 Patologi dan kemoterapi malaria

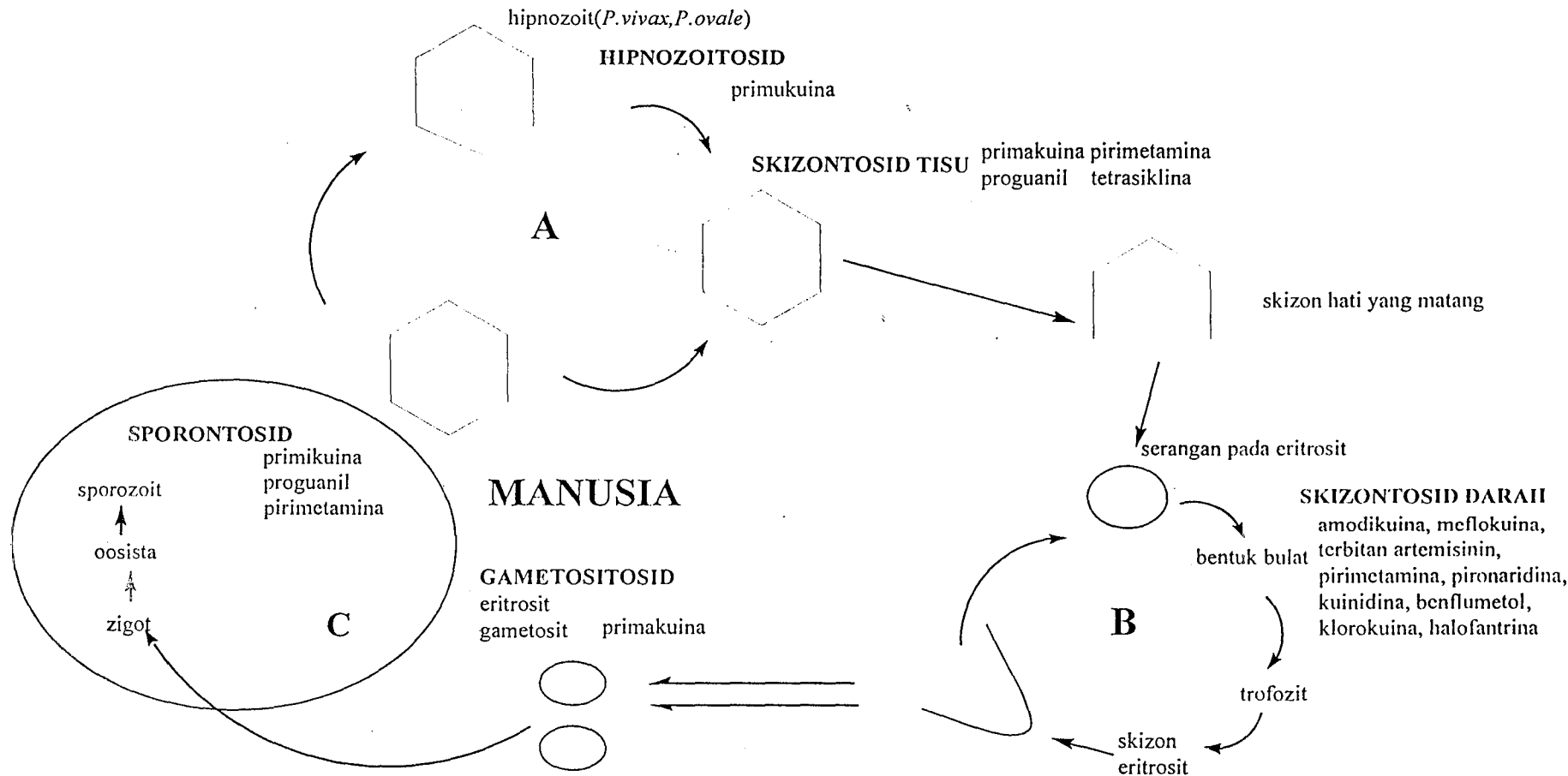
1.3.1 Kitar hidup malaria

Penyakit malaria berjangkit apabila parasit malaria memasuki aliran darah manusia. Parasit tersebut memasuki aliran darah melalui gigitan nyamuk atau pemindahan darah yang dijangkiti atau penggunaan jarum tercemar (Goldman, 1996). Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium* dan nyamuk anopheles betina bertindak sebagai vektor. Terdapat 4 spesies *Plasmodium* yang menghasilkan malaria di dalam manusia iaitu *P.falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale*. Spesies *P.falciparum* merupakan spesies yang menyumbang kepada kes-kes klinikal yang serius dan rumit. Ianya juga merupakan spesies yang membentuk sifat resistant terhadap agen-agen antimalaria (Hudson, 1995). Spesies-spesies lain merupakan parasit malaria yang tidak merbahaya. Di Malaysia, terdapat 434 spesies nyamuk yang membawa penyakit malaria. Daripada jumlah itu, hanya 9 spesies yang telah dilaporkan sebagai vektor. Spesies-spesies tersebut ialah *An. maculatus*, *An. balabasensis*, *An. dirus*, *An. letifer*, *An. campestris*, *An. sundaicus*, *An. dolandi*, *An. leucophyrus* dan *An. flavirostris* (Rahman et al., 1997). Parasit malaria yang menyerang manusia menjalani kitaran pembesaran yang kompleks pada dua fasa utama iaitu di dalam manusia dan di dalam nyamuk betina genus *Anopheles*. Di dalam manusia iaitu fasa aseksual endogenus, parasit membiak berlipat ganda. Pemiakan aseksual ini dikenali sebagai skizogoni. Maka, manusia merupakan perumah perantara.

Pembiakan secara seksual diikuti dengan penggandaan parasit atau sporogoni berlaku di dalam badan nyamuk. Fasa ini dikenali sebagai fasa seksual eksogenus. Dengan hal yang demikian, nyamuk digelar sebagai perumah tetap. Rajah 1.1 menunjukkan beberapa peringkat kitar hidup Plasmodium.

1.3.2 Pembiakan parasit di dalam badan manusia

Fasa aseksual bermula apabila sporozoit yang terdapat di dalam kelenjar air liur memasuki salur darah manusia melalui gigitan nyamuk tersebut. Seterusnya sporozoit ini memasuki sel parenkima hati dan berubah menjadi bulat dan mengalami proses pembesaran selanjutnya. Di dalam tubuh manusia, pembiakan aseksual parasit malaria berlaku di dalam sel parenkima hati (kitar pra-eritrositik) dan dalam sel eritrosit (kitar eritrositik). Di dalam sel parenkima, sporozoit yang memasuki sel-el parenkima hati membentuk tisu skingoni dan setiap skizon ini mengandungi beribu-ribu parasit yang dikenali sebagai merozoit. Merozoit yang lainnya pula akan memasuki eritrosit dan memulakan kitaran eritrositik. Seterusnya, setiap merozoit akan menjadi matang dan menghasilkan skizon di dalam eritrosit. Di dalam skizon ini, terkandung beribu-ribu merozoit baru. Skizon eritrositik yang matang bukan sahaja mengandungi merozoit bahkan juga pigmen dan sitoplasma parasit malaria. Apabila skizon eritrositik matang itu pecah merozoit dan jasad sisa dibebaskan ke dalam salur darah. Demam penyakit malaria dan tanda-tanda bermula penyakit ini berlaku serentak dengan pemecahan skizon eritrositik. Sebilangan kecil merozoit akan berkembang menjadi fasa seksual jantan (gametosit jantan) dan fasa seksual betina (gametosit betina). Kedua-dua jantina gametosit akan memasuki perut Anopheles



Rajah 1.1 Kitar hidup parasit malaria dan kawasan-kawasan tindakan drug-drug antimalaria
 A- fasa skizogoni pra-eritrositik B- fasa skizogoni eritrositik C- fasa sporogonik

untuk membentuk zigot apabila gigitan berlaku sekali lagi. Zigot ini membahagi di bawah permukaan luar membran perut Anopheles untuk menghasilkan sporozoit. Sporozoit ini akan bergerak ke kelenjar air liur dan menunggu masa untuk menjangkit melalui gigitan.

1.3.3 Jangkitan semula dan jangkitan berbalik

Penyakit malaria boleh wujud kembali selepas beberapa bulan atau beberapa tahun setelah rawatan sepenuhnya diberikan. Fenomena ini dikenali sebagai rekrudesens dan biasanya nyata pada pesakit yang dijangkiti oleh *P.vivax* dan *P.ovale*. Keadaan ini terjadi kerana kedua-dua parasit tersebut memiliki satu peringkat tambahan ketika proses eksoeritrositik yang dikenali sebagai hipnozoit. Hipnozoit boleh berkembang di dalam sel hepar dan wujud dalam keadaan dorman. Apabila hipnozoit menjadi aktif, merozoit akan dibebaskan ke dalam salur darah untuk menghasilkan kesan jangkitan berbalik (Krotoski, 1985). Jangkitan berbalik yang disebabkan oleh *P.falciparum* dan *P.malariae* adalah kerana parasit-parasit dari jangkitan awal mampu wujud dan terus bertahan di dalam fasa eritrositik.

1.3.4 Pengkelasan drug antimalaria

Pengkelasan drug antimalaria lazimnya dibahagikan menurut tindakan drug-drug tersebut terhadap peringkat-peringkat tertentu dalam kitar hidup parasit malaria. Pengkelasan yang dilakukankan di sini berpandukan kepada Bruce-Chwatt et al., (1986).

1. Tisu skizontosid menghalang pertumbuhan parasit di peringkat pra-eritrositik di dalam sel hepar lalu menghalang parasit daripada memasuki sel-sel darah merah. Drug antimalaria yang memiliki sifat-sifat seperti ini ialah proguanil, pirimetamina dan 8-aminokuinolina primakuina.

2. Hipnozoitosis berfungsi di peringkat akhir kitar pra-eritrositik. Ia bertindak dengan membunuh *P.vivax* dan *P.ovale* di peringkat tidak aktif di dalam hepar agar pemulihan radikal terhasil.
3. Skizontosis darah bertindak ke atas parasit dengan pantas di dalam fasa aseksual eritrositik. Lazimnya ia dikaitkan dengan tahap penyakit yang serius. Skizontosis mampu menyembuh secara klinikal atau mengurangkan jangkitan keempat-empat jangkitan spesies malaria. Skizontosis juga didapati bertindak semasa kitar eritrositik *P.vivax*, *P.malariae* dan *P.ovale* tetapi tidak bertindak balas terhadap gametosit matang *P.falciparum*. Drug-drug yang termasuk di dalam kumpulan ini ialah alkaloid sinkona (kuinina dan kuinidina), 4-aminokuinolina ((klorokuina) kuinolimetanol (meflokuina), Fenantrimetanol (halofantrina) primetamina, proguanil dan terbitan artemisinin (artemisinin artesunat, asid artesunik, arteter dan artemeter).
4. Gametositosis memusnahkan parasit pada peringkat seksual di dalam darah. Kebanyakan agen skizontosis darah berkesan menentang gametosit *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*. Namun, hanya primakuina mampu menentang gametosit *P. falciparum*.
5. Sporontosis merencatkan pembentukan oosista dan sporozoit di dalam nyamuk Anopheles. Agen-agen yang memiliki sifat tindak balas ini ialah pirimetamina, primakuina dan proguanil.

1.3.5 Vaksin malaria

Pemvaksinan yang berkesan dengan bantuan drug-drug antimalaria yang baru merupakan strategi pengawalan dan pencegahan yang baik serta berkos efektif (Engers & Godal, 1998). Namun begitu, pembentukan vaksin malaria yang berkesan masih tidak ditemui (White, 1996). Akan tetapi, terdapat kemajuan yang signifikan dalam pembentukan vaksin yang efektif untuk menentang penyakit parasit. (Engers et al., 1996).

Kini hanya terdapat dua jenis vaksin, SPf66 dan NANP yang telah menjalani kajian klinikal di kawasan endemic malaria (Reber-Liske et al., 1995, ;Lopez et al., 1994,; Graves & Gelband, 2000). Namun begitu, hanya vaksin SPf66 telah mencapai tahap kajian klinikal sepenuhnya (Dobson, 1996). SPf66, suatu campuran peptida sintetik yang memberi perlindungan daripada *P.falciparum* di peringkat aseksual endogenus (Patarroyo et al., 1988 ; Moreno, & Patarroyo, 1995). Kajian klinikal fasa III menunjukkan SPf66 memiliki kadar keberkesanan 39% di Columbia (Valero et al., 1993), 55% di Venezuela (Noya et al., 1994) dan 66% di Ecuador (Sepertegui et al., 1994). Kajian klinikal di Tanzania pula menganggarkan perlindungan sebanyak 31% terhadap kanak-kanak di antara 1 hingga 5 tahun di kawasan endemic malaria yang tinggi (Alonso et al., 1994). Namun begitu, tiada perlindungan yang bermakna yang melibatkan bayi di antara umur 6 - 11 bulan di Gambia (D'Alessandro et al., 1995) dan kanak-kanak di Thailand (Nosten et al., 1996) dilaporkan. Vaksin kedua iaitu NANP pula dijangka dapat memberi perlindungan terhadap tahap sporozoit di dalam kitar Plasmodium (Graves & Gelband, 2000). Namun begitu, tiada bukti yang ketara bahawa vaksin NANP menghalang jangkitan malaria (Graves & Gelband, 2000).

Keputusan menggunakan vaksin DNA pada model tikus didapati amat menggalakkan (Doolan & Koffman, 1997). Namun begitu, vaksin DNA tidak dapat diguna

secara meluas kerana kekurangan korelasi *in vitro* (Miller et al., 1998) dan keselamatan jangkamasa panjang tidak diketahui (Gilbert & Hill, 1997).

1.4 Rintangan drug

Resistan terhadap drug ditakrifkan sebagai keupayaan parasit untuk berganda serta hidup di dalam kepekatan drug biasa yang boleh menghalang penggandaan spesies tersebut (Bruce - Chwatt et al., 1986).

Salah satu faktor utama yang menyumbang kepada peningkatan kes-kes malaria secara mendadak ialah rintangan parasit terhadap agen-agen antimalaria (Bradell & Fitton, 1995). Klorokuina, drug antimalarial yang berkesan dalam menangani masalah malaria tidak lagi berkesan untuk menentang *P. falciparum* di kawasan endemik malaria (Olliaro et al., 1996). Lantaran itu, penggunaan klorokuina dalam mengatasi parasit malaria tidak lagi berguna (Centre for Disease Control, 1990). Tambahan pula, *P. vivax*, parasit malaria yang kedua paling merbahaya juga membentuk rintangan terhadap klorokuina di Asia. Namun begitu, klorokuina masih menjadi pilihan untuk rawatan malaria yang disebabkan oleh *P. ovale* dan *P. malariae*. Ini kerana kedua-dua spesies ini tidak menunjukkan apa-apa resistant terhadap klorokuina (Wernsdorfer, 1991). Di samping itu, tiada drug-drug anti-malaria yang berkesan dan selamat seperti klorokuina (Keystone, 1990, ; Wyler, 1993, ; White, 1996.) Drug yang paling sesuai untuk rawatan rintangan parasit terhadap klorokuina ialah kuinina atau kuinidina yang diberi secara intravena. Akan tetapi, kedua-dua drug tersebut agak toksik dan peningkatan dalam rintangan parasit terhadap kuinina di Asia Tenggara (Panisko & Keystone, 1990).

Amodiakuina pula digunakan di negara-negara membangun untuk menggantikan klorokuina. Drug ini juga didapati agak toksik dan memiliki sifat rintangan terhadap parasit malaria (Olliaro et al., 1996).

Selain daripada itu, meflokuina juga tidak dapat digunakan dalam rawatan malaria kerana memiliki tahap ketoksikan yang agak tinggi (Luzzi & Peto, 1993). Tambahan pula, rintangan terhadap meflokuina mula terbentuk di sempadan Thai-Kambodia dan di Afrika (Bjorkman & Phillips-Howard, 1990).

Fansidar, kombinasi sulfadokina dan pyrimethamina tidak lagi digunakan dalam merawat malaria kerana ketoksikan dermatologi (Luzzi & Peto, 1993). Ianya juga merupakan drug yang bertindak secara perlahan untuk mengatasi penyakit malaria (Hellgren et al., 1990). Namun begitu, ianya digunakan dalam rawatan parasit malaria di negara-negara membangun kerana kekurangan wang untuk mendapatkan drug-drug yang lain (Hellgren et al., 1990).

Di Malaysia, *Plasmodium falciparum* sudah rintang kepada klorokuina dan fansidar. (Black et al., 1981 ; Navaratnam et al., 1989).

Kini, kajian klinikal baru menunjukkan artemisin dan terbitannya amat berkesan dan selamat untuk rawatan malaria (Meshnick et al., 1996 ; Mcintosh & Olliaro, 2000). Para penyelidik telah mencadangkan drug-drug terbitan artemisinin haruslah digabungkan dengan agen antimalaria yang lain untuk melindungi pembentukan parasit rintang-malaria kedua-dua drug ini (Price, 2000 ; Nosten et al., 2000).

1.5 Status agen-agen antimalaria baru

Kewujudan parasit rintang-malaria drug adalah disebabkan oleh pelbagai faktor termasuk sistem pengawalan vektor dan sistem pencegahan yang berkurangan. Keadaan ini menggalakkan penggunaan drug secara forfilaksis untuk menentang malaria. Kini, usaha untuk membentuk drug-drug serta kombinasi drug-drug antimalaria yang baru telah digandakan memandangkan rintangan parasit malaria semakin meningkat terutamanya *P.falciparum*. Namun, hanya beberapa drug antimalaria yang sedang melalui kajian klinikal (Rosenthal, 1998).

Halofantrina telah dikenalpasti pada 1940an tetapi hanya dimajukan pada 1980an, drug ini dihadkan oleh penyerapan secara oral yang berbeza ketoksikan kardiak (Oaks, et al., 1991 ; Bryson et al., 1992). Atovakuon (Haile & Flaherty, 1993) pula didapati berkesan terhadap malaria selepas diberi secara kombinasi dengan progunil (Radloff et al., 1996). Namun, atovakuon memiliki sifat jangkitan berbalik selepas rawatan. Pironaradina suatu terbitan napatiridina menunjukkan keberkesanan menentang *P.falciparum* di China (Ringwäld et al., 1996). Di antara drug-drug yang baru, artemisinin dan terbitan-terbitannya merupakan agen-agen yang efektif (Meshnick et al., 1996). Namun begitu, untuk mengelakkan jangkitan berulang artemisinin dan terbitannya dicadang diberi secara kombinasi dengan drug anti-malaria yang lain (Nosten et al., 2000).

Kini drug-drug antimalaria diberikan secara kombinasi untuk mengelakkan jangkitan berulang yang disebabkan oleh malaria. Salah satu kombinasi utama yang diberikan secara oral ialah kombinasi artemeter dan benflumetol. Kajian-kajian klinikal di Negara Thai dan India menunjukkan kombinasi ini amat berkesan dan selamat digunakan untuk merawat malaria (Kshirsagar et al., 2000 ; White et al., 1999 ; Vugt et al., 1999). Di samping itu, kajian-kajian klinikal menunjukkan malaron (kombinasi atovakuon dan

proguanil hidroklorida) merupakan agen baru yang berkesan dalam rawatan malaria (Looareesuwan, S, et al., 1999 ; Lundgren & Dragsted, 2000). Selain daripada itu, kombinasi klorokuinina atau amodiakuinina atau meflokuina dengan fansidar (sulfadoksina dan pirimethamina) disyorkan untuk rawatan malaria (McIntosh & Olliaro, 2000; Ezedinachi et al., 1999). Kombinasi-kombinasi ini dibentuk kerana parasit malaria sudah mula rintang kepada klorokuinina, amodiakuinina dan meflokuina apabila drug-drug ini diberikan secara berasingan.

1.6 Artemisinin dan terbitan-terbitannya

Pada tahun 1960an, negara China telah memulakan kajian-kajian ke atas tumbuhan dan herba sebagai sumber rawatan penyakit. Salah satu daripada herba yang dikenalpasti ialah Qinghoa' (*Artemisia annua L.*) yang memiliki nilai-nilai perubatan (Lou & Shen, 1987).

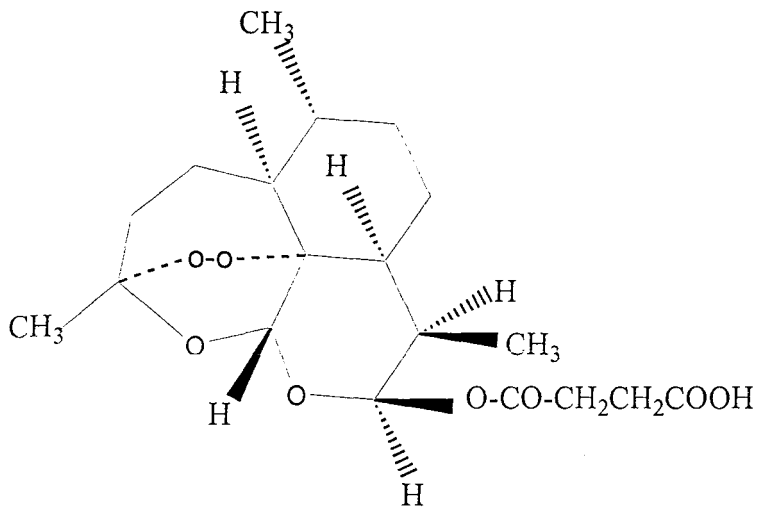
Pada tahun 1972, artemisinin telah diasingkan daripada Qinghao, dan pada 1979 pula strukturnya telah dikenalpasti. Artemisinin merupakan seskuiterpena yang mengandungi jambatan endoperoksida (Webster & Lehnert, 1994 ; de Vries & Dien, 1996). Jambatan endoperoksida ini didapati bertanggungjawab ke atas aktiviti-aktiviti antimalaria artemisinin dan terbitan-terbitannya (Olliaro & Trigg, 1995). Artemisinin telah digunakan dengan jayanya untuk merawat beribu-ribu pesakit malaria di China. Rawatan juga berjaya diberikan kepada pesakit yang dijangkiti dengan *P.falciparum* yang rintang terhadap klorokuina (Leskovoc & Theoharides, 1990). Walaupun artemisinin merupakan drug antimalaria, namun keterlarutan yang rendah di dalam air mengakibatkan keperolehan biologi yang rendah selepas drug tersebut diberikan secara oral (de Vries & Dein, 1996). Terbitan-terbitan artemisinin seperti artemeter (larut di dalam minyak sayuran) dan

artesunat (larut di dalam air) telah dihasilkan. Arteeter pula dilaporkan berkesan secara *in vitro* terhadap strain *P. berghei* dan *P. falciparum*. Tambahan pula, artemeter dan artesunat diserap dengan baik selepas pemberian secara oral (Klayman, 1984).

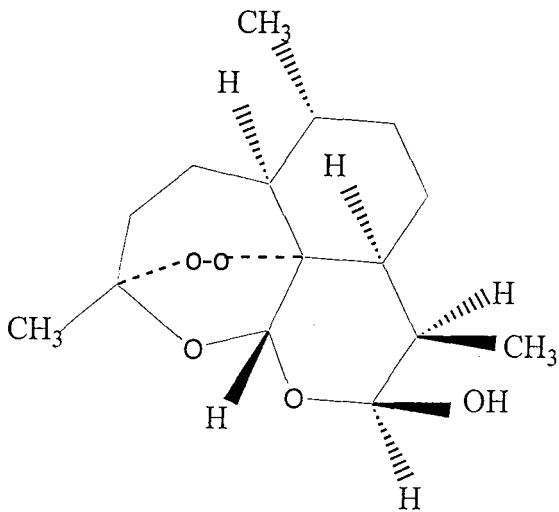
1.7 Asid Artesunik

1.7.1 Pengenalan

Asid artesunik (ARS, rajah 1.2a) merupakan terbitan artemisinin yang wujud dalam formulasi paranteral, oral dan rektal (White, 1994 ; Navaratnam et al., 1998). Agen antimalaria ini juga berkesan untuk menyingkirkan parasit dan demam dengan pantas (Hien & White, 1993) Kajian-kajian klinikal menunjukkan ARS merupakan terbitan artemisinin yang paling berkesan tanpa mengambil kira cara pemberian drug (Hien, 1994). Ianya telah dibuktikan amat berkesan di dalam rawatan kes-kes malaria yang rumit dan tidak rumit (Hien & White, 1993 ; Chinese Cooperative Research Group on Qinghao and its Deravatives as Antimalarials, 1982). Secara am, kesemua terbitan artemisinin dihidrolisis kepada metabolit aktifnya dihidroartemisinin (DHA) dan DHA disingkirkan dengan pantas. DHA juga merupakan satu agen antimalaria yang berkesan (White,1994). Kajian intravena di dalam sukarelawan menunjukkan ARS telah diubah kepada DHA di dalam beberapa minit dan DHA disingkirkan dengan separuh hayat 45 minit (Yang et al., 1986). ARS merupakan agen antimalaria yang amat berkesan pada peringkat eritrositik Plasmodium. Ianya memiliki keberkesanan tinggi dan ketoksikan rendah serta dilaporkan aktif menentang strain *P. falciparum* yang rintang kepada klorokuina . Agen antimalaria ini juga sesuai untuk merawat pesakit malaria serebral dan malaria akut (Xuan et al., 1983).



Asid Artesunik (ARS)



Dihydroartemisinin (DHA)

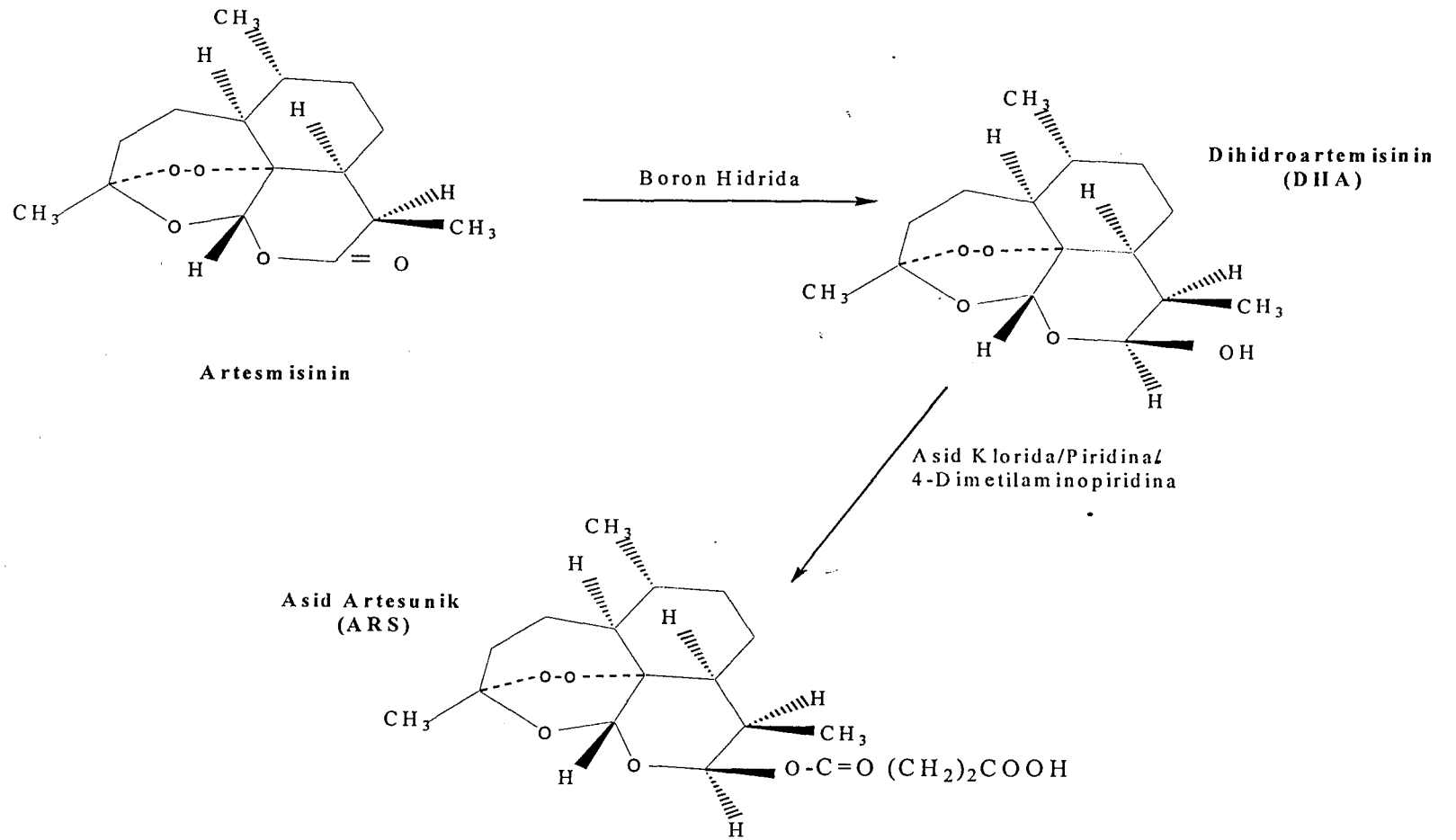
Rajah 1.2 Struktur drug antimalaria terbitan Artemisinin

1.7.2 Sifat-sifat kimia

Nama kimia asid artesunik ialah dekahidro -3,6,9-trimetil-3,12-epoksi-12H-piranol [4,3-j] benzodioksin 10-ol, hidrogen suksinat (Monograph WHO, 1998). Ianya bersifat hablur jarum tanpa warna atau serbuk berhablur putih. Drug ini tidak mempunyai bau atau rasa. Ianya mudah larut di dalam etil alkohol, aseton dan klorofom, manakala kurang larut di dalam air. Formula molekul dan berat molekulnya ialah $C_{19}H_{28}O_8$ dan 384.43 masing-masing. Takat lebur penguraian bagi ARS ialah 131-136°C. ARS larut dalam larutan natrium bikarbonat dan membentuk garam natrium yang larut air. Sintesis asid artesunik berdasarkan tindak balas artemisinin dengan boronhidrida untuk membentuk dihidroartemisinin (Li et al., 1981). Seterusnya, DHA, suatu alkohol ditindak balaskan dengan asid karboksilik untuk membentuk asid artesunik, suatu ester. Proses pengesteran ini berlaku dengan mangkin 4 - dimetilaminopiridina (DMAP) (Lou & Shen, 1987). Rajah 1.3 menunjukkan pembentukan asid artesunik.

1.7.3 Aktiviti anti-malaria

Kepekatan asid artesunik yang diperlukan untuk menghasilkan 50% perencatan (IC_{50}) terhadap *P.falciparum* rintang klorokuina / *P.falciparum* rintang meflokuina/rentan klorokuina ialah 2.18 nmol/L (0.84 mg/L) (Brossi et al., 1988). Kepekatan di atas jauh lebih rendah berbanding dengan kepekatan plasma yang didapati daripada pesakit yang diberikan dos piawai asid artesunik secara intra-otot. Nilai median IC_{50} yang lebih rendah iaitu 0.9nmol/L telah dilaporkan dari 24 kes penghidap *P.falciparum* di Filipina (Bustos et al., 1994).



Rajah 1.3 Sintesis asid artesunik daripada artemisinin (Lou & Shen, 1997)

Kajian-kajian *in vitro* oleh penyelidik lain membuktikan asid artesunik merupakan terbitan artemisin yang paling berkesan (Bustos et al., 1994). Kyle et al., (1992) melaporkan asid artesunik dan meflokuina mempunyai kesan perencatan tambahan terhadap *P.falciparum* di Thailand. Kajian *in vitro* ke atas mencit yang dijangkiti *P.berghei* telah dilakukan dengan 3 dos yang berbeza, iaitu 40, 160 dan 640mg/kg/hari. Keputusan kajian ini menunjukkan administrasi 640mg/kg/hari menyebabkan penyembuhan sepenuhnya manakala kedua-dua dos yang lebih rendah tidak memberikan kesan penyembuhan (Lin et. al., 1987).

1.7.4 Farmakokinetik

ARS mengalami proses hidrolisis kepada DHA di dalam kajian-kajian menggunakan sel-sel darah haiwan dan manusia. Proses ini diandaikan berlaku akibat tindak balas plasma dan/atau tisu kolinesterase (Zhou et al., 1987; Lee & Hufford, 1990; Li et al., 1993). Memandangkan hidrolisis ARS ke DHA adalah sangat ketara, adalah dicadangkan penilaian farmokokinetik dilakukan ke atas DHA di perut sebelum memasuki pendedaran sistematik (White, 1994). Kajian farmokinetik ARS ke atas tikus melaporkan drug tersebut dihidrolisis oleh esterase darah dengan separuh hayat ($t_{1/12}$) 4 minit (Edlund et al., 1984) dan 1.7 minit (Zhou et al., 1987) masing-masing. Separuh hayat hidrolisis ARS didalam anjing pula ialah 0.45 jam (Zhou et al., 1986). Lantaran itu, ARS boleh dianggap sebagai prodrug DHA (Titulaer et al., 1991). Dihidroartemisin pula disingkirkan dengan pantas dengan masa separuh hayat 2.5 jam dalam kajian farmakokinetik menggunakan anjing. Kepekatan DHA berkurangan hingga ke tahap pengesanan dalam masa 2 jam di dalam kajian ke atas tikus (Edlund et al., 1984). Kajian ke atas 12 sukarelawan di Malaysia yang diberikan 200 mg ARS secara oral atau rectal (Navaratnam et al., 1997) menunjukkan tiada perbezaan ketara dengan kajian-kajian

serupa yang dijalankan di Negara Thai (Looreesuwan et al., 1997 ; Than et al., 1992). Keputusan kajian ini menunjukkan penyerapan dan penyingkiran ARS yang berkesan selepas kedua mod pemberian. Namun, adalah dicadangkan pemberian secara rektal mempunyai kelebihan berbanding pemberian secara oral dan pemberian rektal boleh diguna sebagai alternatif untuk pemberian intravena (Navaratnam et al., 1998).

Farmakokinetik ARS dan DHA telah dikaji di dalam 11 pesakit malaria *P.falciparum* di Negara Thai yang diberi ARS secara oral. Kesemua subjek mempunyai medium masa penyingkiran parasit dan demam sebanyak 30 jam (18 hingga 60) dan 24 jam (4 hingga 94) masing-masing. Tiada subjek yang dikaji menunjukkan kesan-kesan kehadiran parasit selama 28 hari (Karbwan et al., 1997).

Fasa akut jangkitan malaria telah mempengaruhi farmakokinetik ARS dan DHA secara signifikan. Perubahan-perubahan yang diperhatikan ialah pencerunan bagi parameter-parameter seperti kepekatan plasma maksimum (C_{max}), sepenuh hayat penyerapan ($t_{1/2a}$) kawasan di bawah lengkung kepekatan plasma-masa (AUC) dan separuh hayat penyingkiran terminal ($t_{1/2z}$).

Namun begitu, nilai jumlah pembersihan jasad meningkat. Tambahan pula, penurunan di dalam nilai C_{max} DHA dan peningkatan nisbah $AUC_{DHA/ARS}$ dijumpai. Keputusan-keputusan kajian ini menyarankan terapi pengoptimuman bagi pemberian ARS secara oral harus berdasarkan kinetik drug ARS dan DHA di peringkat fasa akut jangkitan malaria.

1.8 Dihidroartemisinin

1.8.1 Sifat-sifat kimia

Nama kimia dihidroartemisinin (rajah 1.2b) ialah dekahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoksi-12H-epoxy-12H-piranol [4,3-j]-1,2-] benzodioksipin 10-ol (Monograph WHO,1998). Ianya bersifat hablur jarum tanpa warna atau serbuk berhablur putih. Drug ini tidak mempunyai bau dan rasa. Ianya mudah larut di dalam etil alkohol, aseton, dan klorofom manakala kurang larut di dalam air. Formula molekul dan berat molekul DHA ialah $C_{15}H_{24}O_5$ dan 284.4 masing-masing. Takat lebur penguraian DHA ialah 135-138°C. Sintesis DHA dilakukan berdasarkan tindak balas artemisinin dengan boronhidrida (Li et al, 1979).

1.8.2 Aktiviti anti malaria

Kepekatan dihidroartemisinin yang diperlukan untuk menghasilkan 50% perencatan (IC_{50}) terhadap strain *P.falciparum* yang diasingkan di Cameroon ialah 1.11 nM. DHA juga didapati aktif dalam menentang strain sensitif klorokuina yang diasingkan. Tambahan pula, kini wujud korelasi positif terhadap tindak balas di antara DHA dan meflokuina atau halofantrin. Keputusan ini mencadangkan rintang silang *in vitro* DHA boleh dilakukan (Ringwald et al., 1999). Kajian farmakodinamik ke atas mencit yang dijangkiti *P. berghei* telah dijalankan dengan suntikan intra-otot 5.0 mg/kg. Keputusan kajian ini memberikan nilai dos berkesan (ED_{50}) sebanyak 1.00 ± 0.13 mg/kg dan 6.6 jam diperlukan untuk mengurangkan jumlah parasit kepada separuh. Pemalar kadar penyingkiran ED_{50} ialah 0.2662 jam^{-1} dengan separuh hayat ($t_{1/2}$) 2.6 jam (Li et al., 1989).

1.8.3 Farmakokinetik

Empat puluh pesakit yang menghidap *P.falciparum* yang tidak komplikasi telah diberikan 480mg DHA selama 5 hari dan 640 mg selama 7 hari di Hainan China, satu kawasan endemik malaria. Kajian klinik menunjukkan kesemua pesakit telah sembuh dengan masa penyingkiran parasit 26.1 ± 10.2 jam dan 21.1 ± 11.8 jam pada kajian 5 hari. 58.7 ± 20.9 jam dan 59.4 ± 20.9 pula merupakan masa penyingkiran demam dan masa penyingkiran parasit bagi kajian yang dijalankan selama 7 hari. Tambahan pula, tiada kesan samping akibat drug tersebut dikesan sepanjang kajian (Li et al., 1999).

Looareesuwan et al. (1996) melaporkan dalam kajian ke atas pesakit-pesakit malaria *P. falciparum* tidak rumit yang diberi DHA secara oral melaporkan kebanyakan pesakit menunjukkan peningkatan dari segi klinikal 1-3 hari selepas administrasi drug. Tambahan pula, tiada pesakit dilaporkan mempunyai kesan sampingan yang serius. Dos yang diadministrasikan dalam kajian ini ialah 120mg DHA diberikan serta-merta dan diikuti 60mg/sehari selama 7 hari yang berikutnya . Kadar penyembuhan dilaporkan sebanyak 90%. Tempoh masa penyingkiran parasit dan penyingkiran demam ialah 40.4 jam dan 30.2 jam masing-masing. Lima pesakit yang gagal di dalam kajian ini dirawat dengan jayanya menggunakan kuinina dan tetrasikilina. Maka boleh dimplikasikan bahawa rawatan dengan DHA oral adalah berkesan. DHA mungkin sesuai dalam rawatan alternatif bagi malaria *P.falciparum* akut dan tidak komplikasi.

1.9 Pengenalan Pelarutan

Analisis pelarutan kini menjadi satu ujian penting dalam pengawasan kualiti dari satu kumpulan ke kumpulan yang lain sesuatu drug. Ianya juga digunakan untuk mengkaji aspek fisiologi sesuatu drug di dalam media akueus yang berbeza. Analisis pelarutan *in vitro* juga dijadikan sebagai panduan dalam pembentukan formulasi dan pengawasan dalam penghasilan drug (Shah et al., 1995).

1.9.1 Latarbelakang

Penyerapan drug ke dalam sistem akibat pengambilan dos dalam bentuk kapsul, tablet dan suppositori bergantung kepada pembebasan drug daripada formulasi berkenaan. Maka, proses pembebasan dan penyerapan drug bergantung kepada proses pelarutan dan keterlarutan drug di dalam keadaan fisiologi. Memandangkan, pentingnya langkah di atas, analisis pelarutan *in vitro* adalah mustahak dan relevan dalam ramalan keputusan *in vivo*. Pada amnya, tujuan analisis pelarutan *in vitro* bagi kapsul, tablet dan suppositori digunakan untuk

- a) menilai kualiti produk drug dari satu kumpulan ke satu kumpulan yang lain
- b) menjadi panduan dalam perkembangan formulasi baru
- c) memastikan kualiti produk drug berkekalan selepas perubahan. Antara perubahan yang dimaksudkan ialah perubahan formulasi, perubahan proses penghasilan drug, perubahan tempat penghasilan drug dan perubahan dalam kuantiti yang dihasilkan.

Proses kelulusan sesuatu produk drug memerlukan pengetahuan mengenai keterlarutan, pelarutan dan farmakokinetik sesuatu drug tersebut dan perkara sebegini haruslah diambil kira dalam mentarifikasi spesifikasi analisis pelarutan. Pengetahuan tersebut dan takrifan

spesifikasi pelarutan seterusnya digunakan untuk memastikan sesuatu produk drug yang bakal dihasilkan tidak berbeza daripada produk yang asal. Nilai-nilai keperolehan biologi, pelarutan *in vitro*, sifat-sifat kimia drug, proses penghasilan drug, pencirian kualiti drug dan keupayaan produk drug merupakan ciri-ciri penting untuk mendapatkan kelulusan produk drug baru daripada pihak *Drug Control Agency* (DCA). Nilai-nilai pelarutan biasanya didapati daripada kumpulan drug yang digunakan untuk kajian klinikal dan kajian keperolehan biologi. Perbandingan nilai-nilai bioekuevalens yang diterima dan nilai-nilai pelarutan *in vitro* diperlukan untuk mendapatkan kelulusan produk drug baru. Untuk produk-produk drug termasuk produk generik, spesifikasi pelarutan haruslah berdasarkan nilai-nilai klinikal, keperolehan biologi dan bioekuivalens yang diterima (*Guidence for Industry, Food and Drug Administration, USA, 1998*).

1.9.2 Klasifikasi sistem biofarmaseutik.

Berdasarkan kepada keterlarutan dan ketelapan drug, sistem klasifikasi biofarmaseutik (BCS) telah dicadangkan oleh Amidon, (1995). Klasifikasi tersebut ialah:

Kes 1 : Keterlarutan tinggi dan ketelapan tinggi

Kes 2 : Keterlarutan rendah dan ketelapan tinggi

Kes 3 : Keterlarutan tinggi dan ketelapan rendah

Kes 4 : Keterlarutan rendah dan ketelapan rendah

Klasifikasi ini digunakan sebagai asas dalam menentukan spesifikasi pelarutan *in vitro*. Ianya juga menjadi dasar dalam meramal kejayaan perhubungan *in vivo* dan *in vitro*. Keterlarutan drug ditentukan dengan melarutkan unit dos unit tertinggi drug di dalam 250mL larutan penimbal yang dilaraskan diantara pH 1.0 dan 8.0. Sesuatu sebatian drug dianggap memiliki keterlarutan tinggi jika isipadu larutan tersebut mempunyai nilai yang