

## Kesan Ekstrak Daun Jambu Batu (*Psidium guajava*) terhadap Eritrosit Terjangkit *Plasmodium berghei* NK65

(Effects of *Psidium guajava* Leaf Extracts on Erythrocytes Infected *Plasmodium berghei* NK65)

SHAFARIATUL AKMAR ISHAK<sup>1\*</sup>, NORANIZA ARIFFIN<sup>1</sup> & FIFI FARIZA AZMI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Center for Toxicology and Health Risk Studies, Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia, 50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, Malaysia

<sup>2</sup>Centre for Diagnostic, Therapeutic & Investigative Studies (CODTIS), Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia, 50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, Malaysia

Diserahkan: 16 Ogos 2023/Diterima: 13 Mac 2024

### ABSTRAK

Malaria kini tergolong dalam senarai dunia sebagai penyakit berjangkit yang menyebabkan banyak kematian. Oleh itu, kajian antimalaria secara *ex vivo* oleh ekstrak daun jambu batu (*Psidium guajava*) terhadap mencit yang terjangkit *Plasmodium berghei* (NK65) ini adalah penting dalam penghasilan alternatif ubatan antimalaria yang baharu. Kajian dimulakan dengan ujian penyaringan awal menggunakan darjah parasitemia 10%, diikuti dengan pemilihan pelarut terbaik antara metanol, aseton, etil asetat dan heksana. Hasil mendapati ekstrak metanol menunjukkan bacaan  $IC_{50}$ , 4.270 mg/mL yang menghampiri nilai  $IC_{50}$  piawai klorokuin iaitu 3.080 mg/mL. Ujian statistik ANOVA satu hala membuktikan tiada perbezaan signifikan antara keduanya dan bacaan adalah seperti berikut;  $F(1, 18) = 1.091, p > 0.05 (0.310)$ . Kemudian, ekstrak metanol daun jambu batu terpilih sebagai pelarut terbaik, ini diteruskan dengan ujian parasitemia pada 5%, 10% dan 30%. Keputusan kajian mendapati, aktiviti perencatan malaria lebih berkesan dan cekap pada parasitemia 10% dan ANOVA sehalu menunjukkan  $F(1, 18) = 0.797, p > 0.05 (0.384)$ . Akhir sekali proses sinkronisasi dijalankan dengan menggunakan kaedah sorbitol lisis. Hasil mendapati pada peringkat cecincin (trofozoit muda), bacaan  $IC_{50}$  adalah 0.0001 mg/mL manakala pada peringkat trofozoit matang dan skizon bacaan  $IC_{50}$  hampir sama; 4.295 mg/mL dan 4.276 mg/mL. Kesimpulannya, ekstrak methanol daun *Psidium guajava* menunjukkan adanya aktiviti antimalaria dan berupaya merencatkan semua kitaran hidup sel parasit malaria tetapi lebih berkesan pada peringkat trofozoit matang dan skizon.

Kata kunci: Asai pLDH; malaria; *Plasmodium berghei* NK65; *Psidium guajava*; sinkronisasi

### ABSTRACT

Malaria is included in the list of the world as an infectious disease that causes many deaths. Thus, *ex vivo* studies of antimalarial extract of *Psidium guajava* leaves against *Plasmodium berghei* NK65 in infected mice are crucial as an initiator to produce a new alternative antimalarial drug. Crude extracts of guava leaves were prepared by maceration which uses different solvent polarity gradually which are hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol. It started with the initial screening test using the 10% parasitemia level and the result of methanol extract showed better reading compared to others with  $IC_{50}$ , 4.270 mg/mL approximately closer to  $IC_{50}$  values of the gold standard drug; chloroquine drug, 3.080 mg/mL. One-way ANOVA statistical test showed no significant differences between them;  $F(1, 18) = 1.091, p > 0.05 (0.310)$ . Finally, the methanol extract from guava leaves was picked as the best solvent, and studies were conducted on parasitemia at 5%, 10%, and 30% levels. The result showed that malaria inhibitory activities effectively in 10% parasitemia level and it is not significantly different to chloroquine  $F(1, 18) = 0.797, p > 0.05 (0.384)$ . Finally, the synchronization process was carried out via the sorbitol lysis method. Results found in the ring (early trophozoite),  $IC_{50}$  was 0.0001 mg/mL whereas late trophozoite and schizont showed similar  $IC_{50}$  values which were 4.276 mg/mL and 4.295 mg/mL, respectively. In conclusion, *Psidium guajava* leaf extract methanol showed the presence of anti-malarial activity.

Keywords: Malaria; *Plasmodium berghei* NK65; pLDH assay; *Psidium guajava*; synchronization

## PENGENALAN

Penyakit malaria telah disenarai hitamkan sebagai salah satu penyakit yang menyebabkan banyak kematian khususnya di kawasan tropika (Vagapandu et al. 2004). Dianggarkan terdapat hampir 247 juta kes malaria pada 2021 secara keseluruhan di 84 negara-negara endemik malaria (termasuk Guiana), peningkatan daripada 245 juta pada 2020 dengan peningkatan mendadak daripada negara-negara di Wilayah Afrika (WHO 2022). Walaupun telah banyak langkah kawalan dilakukan, namun masih banyak kematian dilaporkan. Hal ini berikutan dengan kes kerintangan strain *Plasmodium* terhadap ubat-ubatan antimalaria sedia ada.

Antara penyebab utama yang membawa kepada faktor kerintangan ini adalah kebolehan strain *Plasmodium* beradaptasi dengan perubahan persekitaran. Sekali gus menukar komponen genetiknya menjadi lebih rintang. Laporan kerintangan ubat antimalaria (klorokuin) ke atas strain *Plasmodium falciparum* yang pertama di Malaysia dilaporkan pada tahun 1963 oleh Montgomery dan Eyles (1963), diikuti dengan beberapa laporan lain di Sabah (Clyde, Han & Huang 1973), gabungan klorokuin-pirimetamin (Dondero Jr., Parsons & Ponnampalam 1976), sulfadoksin-pirimetamin dan akhir sekali kedua-dua gabungan di kawasan endemik Semenanjung Malaysia (Lokman et al. 1996).

Kemudian, faktor lain yang menyebabkan peningkatan kematian adalah kemiskinan. Menurut laporan yang dikeluarkan oleh Bangsa-Bangsa Bersatu (UN), berdasarkan kenyataan yang dikeluarkan oleh Institut Bumi, Universiti Colombia, malaria dan kemiskinan berkait rapat kerana malaria adalah yang paling sukar dibendung bagi negara dan komuniti termiskin di dunia yang tergolong dalam kelompok kemiskinan dan persekitaran yang kurang sihat (United Nations 2023). Menurut Hyde (2005), *Plasmodium falciparum* telah menjadikan klorokuin dan sulfadoksin semakin tidak berkesan dalam kemoterapi masa kini. Apabila hal sedemikian terjadi, maka Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) menjadikan 'Artemisinin-based combination therapies' (ACTs) sebagai rawatan pertama untuk pesakit tersebut (WHO 2018). Walau bagaimanapun, kerana kos yang tinggi menyebabkan pesakit tidak mendapat rawatan sewajarnya (Mutabingwa 2005).

Faktor lain adalah hujan. Seperti yang diketahui umum, pada musim hujan aktiviti nyamuk adalah amat aktif. Hal ini dibuktikan oleh Gallup, Sachs dan Mellinger (1999) di Garki, Nigeria yang menyatakan seseorang

individu itu berpotensi digigit nyamuk pada purata 174 kali setiap malam manakala di Lembah Kou, Burkina Faso dianggarkan 158 gigitan setiap malam. Justeru itu, jumlah gigitan yang banyak ini membawa kepada risiko menghidap malaria meningkat. Apabila kes malaria meningkat, secara tidak langsung ia mengganggu kerja-kerja rutin dan turut menjejaskan produktiviti kerja bagi yang bekerja dan ketidakhadiran pelajar ke sekolah. Hal ini akhirnya meninggalkan kesan buruk kepada ekonomi dan sektor-sektor lain (Greenwood et al. 2005).

Seterusnya adalah faktor migrasi. Misalnya, di Thailand satu kajian telah dijalankan oleh Singhanetra-Renard (1986) telah mendapati penyebab kepada prevalens malaria yang tinggi di Thailand adalah faktor migrasi ke negara jiran iaitu sempadan Thailand Burma menerusi aktiviti pembalakan mahupun penyeludupan. Selain faktor seperti kurangnya penggunaan kelambu ketika tidur. Oleh yang demikian, pencarian ubat-ubatan antimalaria yang baharu perlu dipergiatkan rentetan daripada kesan kes kematian yang dilaporkan ini. Oleh itu, dipercayai setiap negara pasti mempunyai kepelbagaian tumbuh-tumbuhan yang tersendiri. Sebagai bukti merujuk kepada WHO, lebih daripada 80% populasi dunia hingga ke hari ini masih bergantung secara penuh kepada perubatan herba sebagai penjagaan diri yang utama. Manakala menurut A-SNAPP News (2000), berjuta rakyat di negara-negara Afrika sangat bergantung kepada herba sebagai ubatan pertama dalam penjagaan kesihatan.

Di Malaysia seperti yang diketahui kaya dengan sumber asli yang terdiri daripada 20,000 spesies tumbuh-tumbuhan. Menurut Musa, Muhamad Ghawas dan Mansor (2005), masing-masing menunjukkan ciri-ciri perubatan. Mereka juga menyatakan bahawa tumbuh-tumbuhan yang pelbagai di rantau ini bukan sahaja mempunyai nilai kemoterapeutik tetapi juga turut berpotensi sebagai sumber kimia baharu bagi penemuan ubatan baharu.

Sebagai contoh daun dabai atau *Canarium odontophyllum* telah terbukti dapat merencatkan malaria apabila diuji secara *ex-vivo*, kajian Akmar-Ishak et al. (2021) membuktikan bacaan  $IC_{50}$  untuk ekstrak metanol daun *Canarium odontophyllum* terhadap *Plasmodium berghei* NK65 adalah (0.00045  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) manakala untuk klorokuin (0.0011  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) apabila diuji dengan asai PLDH dan 0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apabila diuji dengan asai SYBR Green 1, yang mana sepuluh kali lebih rendah apabila dibandingkan dengan klorokuin (0.0293  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ini menunjukkan tumbuhan tempatan mempunyai potensi

untuk dibangunkan sebagai antimalaria. Selain sebagai antimalaria, tumbuhan ini juga telah dikaji dan hasil daripada kajian lepas menunjukkan daun *Canarium odontophyllum* terbukti mempunyai pelbagai faedah perubatan seperti antibakteria, antioksidan, antikanser, antidiabetes dan juga anti hipertensi (Muhammad Wahizul et al. 2022). Mengambil contoh juga tumbuhan tempatan di serantau Asia Tenggara, *Picrasma javanica* Blume yang tumbuh secara meluas di Myanmar dan di seluruh Asia Tenggara sehingga ke Pulau Solomon mempunyai ciri-ciri antimalaria seperti yang dilaporkan oleh Taher et al. (2022) yang menunjukkan potensi sebagai antimalaria daripada kajian lepas daripada ekstrak heksana daripada batang dan daun *Picrasma javanica* Blume berkebolehan mengurangkan kadar parasitemia di dalam mencit lebih baik daripada klorokuin. Tumbuhan *Phyllanthus* yang terdapat di Asia telah dikaji kegunaannya dan antaranya adalah *Phyllanthus niruri* yang biasanya digunakan untuk merawat keradangan, demam, malaria, lithiasis dan gonorea. Kajian yang dijalankan oleh Wan Saidin et al. (2023) mengumpulkan data tentang penggunaan tumbuhan ini dan terdapat hypophyllanthin yang merupakan lignan utama yang terdapat dalam pelbagai spesies *Phyllanthus* dan telah digunakan sebagai salah satu penanda bioaktif kimia untuk tujuan kawalan kualiti kerana ia menyumbang kepada kepelbagaian aktiviti farmakologi mereka. *P. niruri* didapati mempunyai kepekatan lignan yang lebih tinggi daripada komponen tumbuhan lain, dengan kandungan phyllanthin adalah yang paling banyak. Hypophyllanthin bertindak dengan melindungi tisu hepar dengan sifat antioksidan.

Dalam kajian yang dijalankan oleh Hussain Ali et al. (2022) ke atas buah *Momordica charantia* (MC) menunjukkan sifat antimalarial dengan ekstrak akueus *M. charantia* menyekat pertumbuhan parasit, menurunkan tahap sitokin pro-radang serum IFN- $\gamma$  (2.7 kali ganda), TNF- $\alpha$  (4.9 kali ganda), manakala tahap sitokin anti-radang IL-10 meningkat (2.3 kali ganda) menunjukkan bahawa kesan anti-malaria MC melibatkan modulasi sitokin yang dimediasi melalui perencatan GSK3 $\beta$  pada tikus yang dijangkiti *P. berghei*. MC mengandungi pelbagai kandungan fitokimia antaranya adalah saponin, steroid, alkaloid, flavonoid, sebatian fenol, triterpena, protein dan polisakarida termasuk sebatian bioaktif, seperti momordenol, momordicilin dan kuersetin yang diketahui menunjukkan sifat perencatan-GSK3 (Ali et al. 2022). Kajian telah dijalankan oleh Safar et al. (2022) ke atas *Diplazium esculentum*, sejenis

pakis yang biasa dimakan oleh masyarakat tempatan di Malaysia sama ada sebagai makanan atau ubat. Kajian telah menunjukkan kesan aktiviti antimalaria ke atas *P. falciparum* dengan ergosterol 5,8-endoperoksida, salah satu penulenan steroid telah dikenal pasti sebagai komponen bioaktif yang terasing daripada ekstrak etil asetat batang *D. esculentum*, yang mana aktiviti antiplasmodial ditunjukkan dalam sebatian ini dikaitkan dengan bahagian peroksidanya, yang hampir sama dengan bahagian peroksida dalam sebatian antimalaria, artemisinin. PfATP6 berkemungkinan menjadi sasaran protein untuk ergosterol-5,8-endoperoksida.

Oleh yang demikian, dalam kajian ini daun jambu batu digunakan untuk menguji aktiviti antimalaria. Menurut kajian oleh Holetz et al. (2002) telah membuktikan bahawa tumbuhan *Psidium guajava* mempunyai potensi dalam merawat pelbagai penyakit misalnya di Brazil, buah dan daun tumbuhan ini digunakan untuk pesakit anoreksia, kolera, cirit-birit, pesakit dengan masalah sistem penghadaman, disentri, sakit tekak dan ulser. Bukan itu sahaja, ekstrak daun *P. guajava* turut digunakan sebagai perencat hakisan hijau. Kajian yang dijalankan oleh Naba Jasim et al. (2023) mengenai penggunaan pelbagai tumbuhan sebagai perencat kakisan hijau untuk medium berasid dengan kecekapan perencatan tinggi (IE%) yang mana ekstrak daun *Psidium guajava* menunjukkan kecekapan perencatan 82% pada 1200 mg/L. Dalam kajian lain oleh Fatin Nabila dan Nur Ain Izzati (2023) telah menunjukkan potensi penggunaan ekstrak etanol daun *P. guajava* sebagai salah satu agen anti-kulat sebagai rawatan lepas tuai bagi mengurangkan kehilangan hasil buah dengan peratus pengurangan pertumbuhan *Fusarium oxysporum* adalah sebanyak 46.68%. Menurut kajian lepas (Siti Balkis, Hawa & Pek Lian 2013) pula menunjukkan bahawa ekstrak akueus kulit buah *P. guajava* berpotensi menurunkan tekanan oksidatif tisu pankreas pada tikus diabetes dan berkemungkinan dapat berperanan dalam mengurangkan komplikasi diabetes.

Merujuk kepada penelitian oleh Nwinyi Obinna, Chinedu Nwodo dan Ajani Olayinka (2008), secara farmakologi tumbuhan *P. guajava* menunjukkan potensi sebagai ubat cirit-birit, anti hipertensi, pelindung kepada hepar, antioksidan, anti mikrobiologi dan hipoglisemia. Manakala menurut Argueta dan Cano (1994) pula menyatakan *P. guajava* secara meluas dimanfaatkan di Mexico dalam merawat penyakit gastroenteritis dan gangguan pernafasan.

Dari segi bioaktif tumbuhan, kajian oleh Naseer et al. (2018) membuktikan daun *P. guajava* mengandungi banyak sebatian yang bertindak sebagai agen fungistatik dan bakteriostatik. Jambu batu mempunyai kandungan antioksidan penting yang tinggi dan mempunyai keupayaan pelindung radioaktif. Kuersetin dianggap sebagai antioksidan paling aktif dalam daun *Psidium guajava* dan bertanggungjawab untuk aktiviti spasmolitik. Ekstrak etil asetatnya boleh menghentikan jangkitan kuman dan pengeluaran timus. Jambu batu mempunyai aktiviti anti-virus, anti-radang, anti-plak dan anti-mutagenik. Kesimpulannya, daun *P. guajava* telah dipilih dan akan diuji secara *ex vivo* bagi menilai potensi aktiviti antimalaria dan penelitian bacaan  $IC_{50}$  terhadap *P. berghei* NK65 dalam kajian ini.

#### BAHAN DAN KAEDAH

##### SAMPEL DAN REKA BENTUK KAJIAN

Kajian ini melibatkan proses ekstrak daun jambu batu dan kaedah *ex vivo* terhadap mencit yang dijangkit *Plasmodium berghei* NK65 secara kultur, diikuti dengan pemantauan peratusan parasitemia pada 5%, 10% dan 30% serta selanjutnya dilakukan proses sinkronisasi untuk menilai tahap perencatan  $IC_{50}$  mengikut kitar hidup malaria.

##### PENYEDIAAN EKSTRAK DAUN *Psidium guajava* MENGIKUT POLARITI PELARUT

Daun jambu batu (*Psidium guajava*) diambil daripada Jabatan Pertanian, Serdang, Selangor dengan nombor baucer tumbuhan diperoleh daripada Herbarium Taman Botani, Putrajaya (HTBP 4285). Daun *P. guajava* kemudiannya dikeringkan dan dihaluskan dengan cara mengunting dan dikisar. Kemudian, daun direndamkan semalaman ke dalam empat pelarut berbeza polariti bermula dengan larutan heksana (non-polar), etil asetat (semi polar), aseton (semi polar) dan metanol (polar) sebanyak tiga kali pada setiap pelarut. Suhu serta tekanan yang digunakan adalah berbeza-beza iaitu heksana (180 mbar, 30 °C), etil asetat (180 mbar, 40-45 °C), dan metanol (145 mbar, 30-35 °C). Manakala ekstrak aseton diperoleh melalui kaedah fraksinasi aseton menggunakan ekstrak kasar metanol. Campuran ekstrak seterusnya ditapis menggunakan kertas turas Whatman No. 1. Akhir sekali, serbuk disimpan pada suhu 4 °C untuk kegunaan seterusnya. Ekstrak kasar ini dijadikan dos untuk menguji aktiviti antimalaria ke atas mencit yang dijangkit *Plasmodium berghei* NK65.

#### PERTIMBANGAN ETIKA

Kajian ke atas mencit dilakukan menurut panduan etika haiwan dan diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia (FSK/BIOMED/2012/SHAFARIATUL/21-NOV./467-NOV.-2012-JULY-2013). Sebanyak 40 ekor mencit strain ICR betina/jantan diperoleh daripada Rumah Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia dengan berat 20-30 g. Kemudian, mencit tersebut dipindahkan ke Makmal Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia Kampus Kuala Lumpur (UKMKL). Mereka diberi makan makanan berbentuk pelet dan minuman secara *ad libitum*. Kajian dimulakan dengan penyimpanan mencit stok normal dan penyediaan mencit stok dijangkit *Plasmodium berghei* NK65.

##### PROSES INOKULAT PARASIT *Plasmodium berghei* NK65

Untuk mendapatkan bacaan parasitemia, teknik inokulasi dan suntikan *Plasmodium berghei* NK65 dilakukan secara intravena dan kemudian, mencit ini dibiarkan selama beberapa hari sehingga mencapai parasitemia 5%, 15% dan 30%. Penentuan peratusan parasitemia dilakukan dengan mengambil darah daripada ekor mencit setelah beberapa hari inokulat parasit dilakukan melalui filem darah nipis diwarnakan dengan pewarnaan Giemsa. Penentuan ini dilakukan dengan pengiraan formula oleh Elifioye dan Agbedahunsi (2004).

##### PROSES PENGASINGAN ERITROSIT DENGAN SERBUK CF11

Apabila peratusan darjah parasitemia yang dikehendaki telah tercapai, pembedahan dilakukan di bahagian yang berhampiran dengan abdomen, iaitu kawasan yang mempunyai salur darah arteri vena yang besar bagi membolehkan kesemua darah mencit dikeluarkan. Seterusnya, darah yang terkumpul di dalam tiub EDTA/heparin dilakukan proses pengasingan eritrosit dengan menggunakan kolum serbuk CF11, yang bertujuan penyingkiran sel-sel debris, sel darah putih dan sel platelet dapat dilakukan. Proses pengasingan ini dimulai dengan reagen pencuci dan diikuti dengan sampel darah mencit. Kemudiannya, hasil tapisan dilakukan melalui proses pengemparan darah selama 5 minit, 1600 rpm pada suhu 24 °C sebanyak tiga kali dengan tujuan untuk mendapatkan mendapan eritrosit.

##### PENGUKURAN PERATUS PARASITEMIA

Apusan darah langsung dilakukan dengan mengambil setitis darah daripada ekor mencit, dengan memotong



sedikit pada ekor mencit lalu dititiskan pada slaid kaca. Hasil sebaran darah tersebut ditetapkan dengan pelarut metanol 100% selama satu minit. Setelah slaid kering, pewarnaan medan dilakukan dengan cara mencampurkan pewarnaan Medan A dan pewarnaan Medan B dalam nisbah 1:9. Dititiskan ke atas slaid lalu dibiarkan selama 15-20 minit.

Filem darah nipis kemudian dibilas di bawah aliran paip air sehingga tiada lagi warna medan yang melekat pada slaid kaca darah. Akhir sekali, slaid dibiarkan kering pada suhu bilik supaya pemerhatian dengan pembesaran 100x menggunakan mikroskop cahaya kelihatan dengan jelas tanpa gangguan debris atau artifak. Peratusan parasitemia ditentukan dengan menggunakan formula oleh Elifioye dan Agbedahunsi (2004).

#### SINKRONISASI

Proses sinkronisasi bermula dengan mencampurkan eritrosit dengan larutan sorbitol. Campuran ini dieramkan di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 10 minit (setiap dua minit dikeluarkan daripada inkubator, digoncang secara perlahan-lahan dan proses ini diulang sebanyak tiga kali). Proses ini dilakukan untuk memastikan morfologi cecincin yang tulen diperoleh dan pada masa yang sama bertindak melisis skizon dan trofozoit. Kemudian, proses pengempuran pada 16 000 g RPM, 24 °C selama lima minit dijalankan. Akhir sekali, darah dicuci dengan larutan media tidak lengkap bagi tujuan penyingkiran saki baki larutan sorbitol.

#### PENGKULTURAN DALAM MEDIA

Darah yang diperoleh hasil daripada proses sinkronisasi dikulturkan dalam larutan media lengkap dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37 °C mengikut tempoh jam yang dikehendaki (jam ke-6, ke-18 dan ke-22). Perbezaan masa adalah penting bagi mendapatkan peringkat malaria yang berbeza iaitu pada jam ke-6 cecincin (trofozoit muda), trofozoit matang pada jam-18 dan akhir sekali jam ke-22 adalah skizon (Visalini 2010).

#### PENGASAIAN PLASMODIUM LAKTAT DEHIDROGENASE (pLDH)

10 µL sel eritrosit dimasukkan ke dalam 96 telaga microtiter yang baharu bersama dengan 20 µL reagen Malstat dan 20 µL reagen NBT-PES dalam keadaan gelap kerana reagen NBT-PES bersifat fotosensitif. Setiap sampel dilakukan dalam tiga replikasi bagi mendapatkan bacaan purata menggunakan pembaca ELISA pada gelombang 655 nm.

#### PENGIRAAN AKTIVITI MALARIA DAN UJIAN ANALISIS STATISTIK

Semua data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Microsoft Excel 2007, dengan penggunaan Software R regresi bukan linear untuk penentuan bacaan IC<sub>50</sub> dan ujian ANOVA satu hala. Secara ringkasnya, IC<sub>50</sub> merujuk kepada kepekatan ubat tertentu dan ia berkebolehan bertindak mengurangkan 50% parasitemia daripada 100% sel parasit dalam darah mencit dan rumusnya adalah seperti berikut;

Formula IC<sub>50</sub>:

$$\frac{(\text{Sel eritrosit terinfeksi} + \text{ekstrak}) - (\text{sel eritrosit normal dalam media})}{(\text{Sel eritrosit terinfeksi dalam media}) - (\text{sel eritrosit normal dalam media})} \times 100$$

\*Sel eritrosit normal dalam media- sebagai kawalan

Dalam kajian ini, penggunaan Perisian R regresi bukan linear adalah amat penting untuk mendapatkan bacaan IC<sub>50</sub> yang lebih jitu dan jelas. Akhir sekali, hasil kajian dinyatakan dalam purata ± purata ralat piawai (SEM) dan nilai dianggap signifikan apabila p<0.05.

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

Hasil ekstrak kasar daun *P. guajava* menggunakan larutan metanol, aseton, etil asetat dan heksana masing-masing menghasilkan dua warna yang berbeza dengan metanol, etil asetat dan aseton adalah berwarna hijau dan bersifat likat. Manakala heksana pula menunjukkan warna kekuning-kuningan atau coklat gelap dan likat. Bagi mengelakkan ekstrak kasar ini rosak atau ditumbuhi kulat, maka ekstrak kasar ini disimpan di dalam peti sejuk dengan keadaan bertutup.

Daun *P. guajava* yang diperoleh segar ditimbang dan keputusan akhir mendapati berat bersih daun kering *P. guajava* adalah 700 g. Apabila dilakukan proses rotawap, peratusan hasil untuk pelarut ekstrak heksana (7.84%) adalah peratusan hasil yang paling tinggi, etil asetat (5.2%), methanol (4.45%) dan aseton mencatat peratusan hasil terendah dengan 1.43%. Daripada hasil ini dapat dilihat pelarut heksana adalah pelarut pengekstrakan terbaik berbanding pelarut aseton, dengan hasil lebih banyak terekstrak daripada bahan pelarut tidak berpolar.

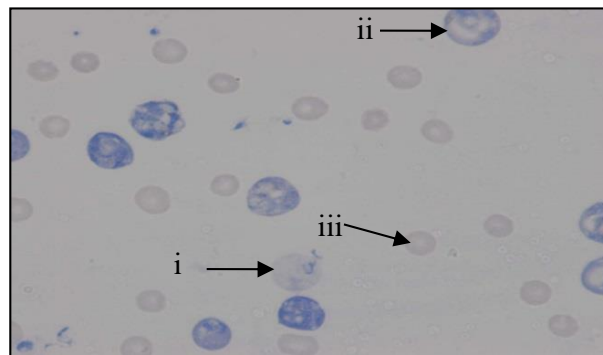
Pemilihan larutan mengikut polariti; iaitu metanol, aseton, etil asetat dan heksana adalah berpandukan kepada pembahagian kumpulan polariti molekul itu sendiri iaitu bersifat polar, semi polar dan tidak berpolar, dengan metanol dikategorikan sebagai polar, aseton dan

etil asetat sebagai semi polar manakala heksana mewakili tidak berpolar. Memandangkan kajian ini masih baharu dan tidak banyak kajian yang pernah dilakukan ke atas daun *P. guajava*, maka pembahagian mengikut polariti ini wajar dilakukan kerana kebolehekstrak dan keterlarutan ekstrak yang berbeza dalam pelarut yang berbeza kesemuanya tidak diekstrak dalam pelarut tertentu (Gil-Martín et al. 2022). Dalam kata lain, heksana berfungsi untuk mengekstrak keluar bahan aktif yang mempunyai polariti rendah. Aseton dan etil asetat pula berfungsi untuk mengekstrak bahan aktif yang berpolariti sederhana dan akhir sekali metanol dapat mengekstrak bahan aktif yang berpolariti tinggi.

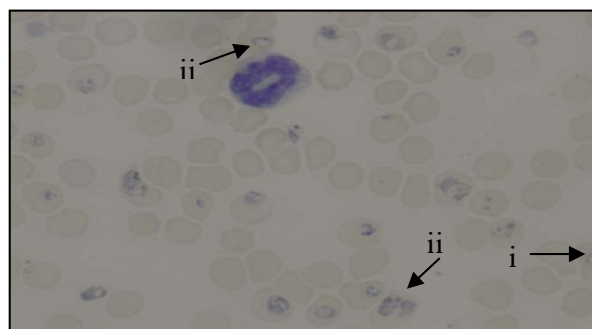
Selanjutnya, kajian penyelidikan diteruskan dengan penentuan darjah parasitemia. Ia adalah amat

penting dalam mendapatkan peratusan parasitemia yang dikehendaki oleh kajian iaitu; 5%, 10% dan 30%. Oleh yang demikian, gambar 1(a) dan 1(b) menunjukkan sampel filem darah nipis darah mencit yang dijangkit parasit *Plasmodium berghei* dengan 100x pembesaran menggunakan mikroskop cahaya.

Berdasarkan pemerhatian gambar 1(a) dan 1(b) ini, (i) morfologi sel eritrosit yang terjangkit adalah lebih besar daripada normal (makrositosis) dan hipokrom serta (ii) beberapa morfologi peringkat *P. berghei*, antaranya adalah peringkat cecincin, peringkat trofozoit, peringkat skizon, peringkat gametosit di dalam sel eritrosit dapat dilihat dengan jelas dan (iii) akhir sekali dapat dilihat morfologi sel eritrosit dalam keadaan beranemia (tidak banyak bilangan sel eritrosit).



GAMBAR 1(a). Morfologi eritrosit (makrositosis dan hipokrom) (i), bergametosit (ii), dan normal (iii) seperti yang dilabel di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 100x dengan menggunakan minyak benaman



GAMBAR 1(b). Morfologi *Plasmodium berghei* berperingkat trofozoit muda (i), trofozoit matang (ii) dan skizon(iii) di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 100x dengan menggunakan minyak benaman

Seterusnya, pengiraan darjah peratusan parasitemia adalah berdasarkan formula oleh Elifoye dan Agbedahunsi (2004). Sebagai contoh gambar 1(a) dianggarkan berparasitemia 30% manakala gambar 1(b) adalah berparasitemia 26%, setelah 10-11 hari disuntik.

Signifikan pengiraan darjah parasitemia dalam kajian ini adalah kerana ia merupakan kaedah yang biasa digunakan setiap kali pengujian ke atas malaria dilakukan dan berfungsi dalam menentukan tahap positif mencit setelah beberapa hari diinokulatkan *P. berghei*. Selain daripada itu, pewarnaan giemsa atau medan adalah piawai emas sebelum ujian lanjutan menggunakan metod pengasaian enzim pLDH dan pengasaian SYBR green I.

Memandangkan kajian ini adalah baharu, ubat klorokuin sebagai piawai emas digunakan sepanjang proses penyelidikan ini dijalankan. Selain itu, piawai emas ini juga digunakan dalam perbandingan signifikan antara ekstrak dengan ubat klorokuin. Seperti yang diketahui, ubat klorokuin telah mula menunjukkan sifat kerintangan terhadap beberapa strain, namun begitu ubat ini masih luas digunakan oleh kebanyakan negara. Oleh yang demikian, bagi mendapatkan tahap optimum aktiviti pLDH, maka ujian penilaian tahap optimum aktiviti pLDH ke atas jumlah mikrolit darah segar iaitu 5  $\mu$ L dan 10  $\mu$ L dilakukan. Hasil mendapati penggunaan kuantiti darah 10  $\mu$ L adalah lebih relevan berbanding dengan 5  $\mu$ L eritrosit, disokong oleh penggunaan regresi bukan linear seperti Jadual 1.

Konsep pLDH dengan menggunakan prinsip keupayaan pLDH (Makler & Hinrichs 1993) yang telah diubah suai dan dikaitkan dengan jumlah mikrolit darah untuk kelancaran pembacaan ELISA dijalankan. Selanjutnya, kajian penentuan untuk bacaan  $IC_{50}$  bagi keempat-empat pelarut ekstrak *P. guajava*; metanol, aseton, etil asetat dan heksana dijalankan bagi menentukan pelarut ekstrak dengan aktiviti perencatan terbaik. Jadual 2 menunjukkan bahawa bacaan  $IC_{50}$  ekstrak metanol daun *P. guajava*, 4.27 mg/mL adalah lebih menghampiri nilai piawai emas ubat klorokuin, 3.08 mg/mL berbanding dengan pelarut lain.

Menurut keputusan yang diperoleh, metanol telah dipilih sebagai pelarut terbaik berbanding dengan pelarut organik yang lain. Ini seiring dengan hasil kajian yang dijalankan oleh Tay dan Chong (2016) ke atas ekstrak daun betik menggunakan methanol dan terdapat lebih banyak bahan berpolar di dalam *P. guajava*. Etil asetat pula berkemampuan menarik flavonoid dan steroid manakala metanol menurut kajian Lozoya et al. (1994), berkebolehan menarik kuersetin aglikon bersama-sama dengan lima glikosida yang lain iaitu kuersetin 3-O-alpha-L-arabinoside (guajavarin), kuersetin 3-O-beta-D-glucoside (isokuersetin); kuersetin 3-O-beta-D-galactoside (hiperin), kuersetin 3-O-beta-L-rhamnoside (quercitrin), kuersetin 3-O-gentobioside.

JADUAL 1. Bacaan  $IC_{50}$  ( $\mu$ g/mL) pada 5  $\mu$ L dan 10  $\mu$ L darah (N:40)

	Jumlah darah	Bacaan $IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)
1	5 $\mu$ L (4-5% hematokrit)	Tidak sah
2	10 $\mu$ L darah (9-10% hematokrit)	960.26 $\pm$ 102.1

JADUAL 2. Keputusan bacaan  $IC_{50}$  (mg/mL) metanol, aseton, etil asetat, heksana ekstrak kasar daun *Psidium guajava* dan ubat klorokuin (sebagai kawalan positif) ke atas 10  $\mu$ L darah secara tiga replikasi (N:40)

	Pelarut ekstrak kasar	Bacaan $IC_{50}$ (mg/mL)
1	Ubat klorokuin (kawalan positif)	3.08
2	Metanol <i>P. guajava</i>	4.27
3	Aseton <i>P. guajava</i>	4.40
4	Etil asetat <i>P. guajava</i>	4.67
5	Heksana <i>P. guajava</i>	4.67

Kajian oleh Nor Akmalazura, Nurul Alia dan Nurul Iman (2020) pula menunjukkan kecuali alkaloids, kehadiran fitokimia yang lain termasuk terpenoid, yang merupakan komponen penting dalam aktiviti malaria (Rocha e Silva et al. 2015) menguatkan hujah keberkesanan ekstrak metanol dalam kajian antimalaria ini.

Walaupun nilai bacaan  $IC_{50}$  bagi kesemua larutan dalam penyelidikan ini adalah sangat besar; ekstrak larutan metanol, (4.27 mg/mL), aseton, (4.40 mg/mL), etil asetat, (4.67 mg/mL) dan heksana, (>10 mg/mL) manakala untuk piawai emas klorokuin, (3.08 mg/mL). Namun begitu, merujuk kepada peratusan  $IC_{50}$  mengikut piawai yang ditetapkan WHO untuk pembangunan antimalaria, kesemua bacaan  $IC_{50}$  adalah dikategorikan sebagai bahan yang sangat aktif (Bethel Kwansa-Bentum et al. 2019; WHO 2019). Walau bagaimanapun, apabila disemak semula akan kaedah yang digunakan oleh kajian lepas didapati kajian mereka adalah sangat berlainan dengan kajian kali ini. Contohnya seperti kajian oleh Rasoanaivo et al. (2004), darjah parasitemia 1.5% dan 2.0% hematokrit sahaja digunakan dan melibatkan strain *P. falciparum* secara *in vitro*. Tetapi dalam kajian ini darjah parasitemia yang digunakan adalah besar iaitu 5%, 10% dan 30%. Maka, ekstrak metanol dipilih untuk pengujian seterusnya.

Selanjutnya, pengujian ekstrak metanol ini diteruskan dengan menggunakan parameter darjah parasitemia yang berbeza peratusan; 5%, 10% dan 30%. Darjah parasitemia 5%, 10%, dan 30% dipilih kerana peratusan ini melambangkan tahap keterukan apabila seseorang dijangkiti malaria. Dalam kajian ini, parasitemia 5% merujuk kepada jangkitan rendah, 10% parasitemia adalah jangkitan sederhana dan 30% adalah jangkitan berat. Mengikut kajian lepas oleh Peng et al. (2014), parasitemia kurang daripada 5% lebih sesuai digunakan untuk kajian sensitiviti dan spesifikasi contohnya bagi menguji teknologi terkini seperti '*magnetic resonance relaxometry*' (MRR) dan ia dapat menguji walaupun pada paras 0.0001%. Keputusan yang diperolehi mendapati

pada tahap keterukan sederhana (parasitemia 10%), tindakan ekstrak pelarut metanol adalah yang terbaik jika dibandingkan pada tahap keterukan rendah dan berat. Hal ini dibuktikan oleh keputusan dalam Jadual 3.

Berdasarkan kajian, dapat disimpulkan pada peringkat parasitemia 5% (4-6 hari) trofozoit muda merupakan majoriti morfologi, pada parasitemia 10% (7-8 hari), trofozoit matang dan pembentukan skizon. Pada parasitemia 30% (9-13 hari) skizon dan gametosit adalah majoriti morfologi yang hadir. Hal ini bertepatan dengan kajian yang dilakukan oleh Mohd Fakhrul dan Hasidah (2009) yang menyatakan bahawa daripada hasil kajian mereka melalui kaedah pemerhatian morfologi, mendapati pada hari ke tujuh peringkat trofozoit didapati paling banyak dan diikuti hari yang ke 13 skizon mencatatkan nilai peratusan yang paling tinggi. Kesemua peringkat wujud pada setiap peratusan, cuma berbeza dari segi kuantiti dalam darah sahaja yang mana peningkatan peringkat morfologi skizon adalah berkolerasi dengan kemerosotan peratusan peringkat cecincin atau trofozoit muda. Justeru, ciri klinikal yang dapat dilihat pada mencit yang dijangkit *P. berghei* adalah mengigil, bahagian telinga dan mata pucat dan tidak aktif. Hal ini terjadi berikutan komplikasi hemolisis eritrosit pada hari ke 6, 9, dan ke 10 apabila aktiviti pembebasan merozoit terjadi.

Selanjutnya, signifikan pemilihan darjah parasitemia yang besar dalam kajian ini adalah kerana mengikut realiti di mana seseorang pesakit itu akan dihantar ke hospital apabila simptom muncul yang memakan masa berhari. Maka ia berbalik kepada prinsip kitar hidup aseksual dan seksual plasmodium sewaktu berada dalam tubuh badan manusia. Malah mengikut prosedur operasi piawai yang dilakukan di makmal; filem darah nipis dilakukan dengan segera bagi melihat tahap keterukan dan parasitemia dalam badan pesakit (KKM 2013). Seperti kajian oleh Thurston (1953) yang menyatakan bahawa pada peringkat awal jangkitan adalah < 10% parasitemia disebabkan oleh tempoh pengeraman selepas penyuntikan parasit ke dalam mencit.

JADUAL 3. Keputusan bacaan  $IC_{50}$  (mg/mL) ekstrak metanol daun *Psidium guajava* ke atas darjah parasitemia yang berbeza secara tiga replikasi (N:40)

	Ekstrak Metanol	Bacaan $IC_{50}$ (mg/mL)
1	Parasitemia 5%	> 10
2	Parasitemia 10%	4.27
3	Parasitemia 30%	4.37



Sebab lain kenapa 30% darjah parasitemia dikatakan sebagai jangkitan paling tinggi dalam kajian ini berbanding dengan pemilihan 40%-70% kerana, kebanyakan mencit akan mati awal daripada tempoh yang dijangka. Tambahan pula kajian ini memerlukan banyak bilangan ekor mencit terutama pada darjah parasitemia 30%. Seperti yang diketahui, apabila mencit dijangkit oleh plasmodium, maka penghasilan eritrosit dan hemoglobin akan terganggu.

Selain daripada itu, bacaan  $IC_{50}$  untuk proses sinkronisasi daripada setiap larutan pelarut kebanyakannya menunjukkan ralat yang agak besar daripada nilai minimum walaupun adanya peratusan perencatan  $IC_{50}$  seperti Jadual 4. Misalnya bagi peringkat trofozoit dan skizon, masing-masing menunjukkan bacaan  $IC_{50}$   $4295.75 \pm 82484.57 \mu\text{g/mL}$  dan  $4275.57 \pm 89444.55 \mu\text{g/mL}$ , juga taburan graf yang tidak normal dan homogen terutama untuk aseton dan heksana sewaktu pemilihan dilakukan. Hal ini mungkin disebabkan oleh pengaruh pemilihan spesies *P. guajava*, seperti jenis tanah ia ditanam, faktor serangga dan iklim hujan panas yang tidak menentu. Hal ini dibuktikan oleh Yang et al. (2018) yang menyatakan bahawa faktor luaran seperti iklim dan jenis tanah mempengaruhi bahan aktif yang terdapat dalam tumbuhan tersebut. Ia turut disokong oleh Coley dan Barone (1996) yang menyatakan bahawa kehadiran serangga-serangga artropod juga turut mempengaruhi nilai bacaan data. Hal ini kerana apabila tumbuhan tersebut dimakan oleh sekumpulan serangga selama kitaran hidupnya, maka ia akan menyebabkan tumbuhan tersebut terpaksa menghasilkan semula metabolit yang telah hilang dengan metabolit baharu. Proses sinkronisasi dilakukan dengan menggunakan sorbitol sebagai agen sinkronisasi untuk tindakan lisis osmosis ke atas sel darah merah yang berparasit. Disebabkan setiap morfologi sel parasit mempunyai perbezaan ketelapan membran yang berbeza-beza, maka ia menjadi sebab untuk kajian ini dijalankan. Tambahan pula, menurut Soni et al. (2005) ketidakstabilan

membran rangka eritrosit sel parasit skizon dan trofozoit adalah disebabkan oleh enzim protease yang bertindak menghidrolisiskan hemoglobin eritrosit terjangkit dan menyahstabilkan strukturnya.

Memandangkan kajian antimalaria terhadap pencilan daun *P. guajava* adalah masih baharu maka mekanisme tindakan perencatan daripada ekstrak jambu batu ini masih belum jelas. Maka ujian sinkronisasi dilakukan yang bertujuan untuk mendapatkan peringkat parasit yang khusus melalui kaedah lisis sorbitol. Merujuk kepada kajian lepas oleh Visalini (2010), peringkat cecincin atau trofozoit muda yang paling banyak adalah pada jam ke-6, manakala peringkat trofozoit matang pada jam ke 18 dan pada jam ke 22 adalah peringkat skizon. Justeru, apabila dilakukan pengkulturan ke atas parasit tersebut selama 24 jam, hasil dalam kajian ini menunjukkan bacaan pada peringkat trofozoit matang dan skizon adalah hampir sama iaitu masing-masing  $4.27 \text{ mg/mL}$  dan  $4.29 \text{ mg/mL}$  manakala peringkat trofozoit muda adalah  $0.01 \text{ mg/mL}$ . Malah menurut Roncales et al. (2015), sorbitol digunakan untuk merencatkan kematangan parasit melalui kaedah kejutan osmotik tanpa menjejaskan sel darah merah tak terjangkit dan sel darah merah terjangkit dengan cecincin parasit.

Oleh itu, boleh disimpulkan bahawa aktiviti perencatan pada setiap peringkat memerlukan dos kepekatan yang berbeza. Merujuk kepada kajian oleh Kayser, Kiderlen dan Croft (2000), apabila ubat-ubatan antimalaria sedia ada mempunyai kesan perencatan yang khusus, maka dipercayai bahan aktif daripada sumber tumbuhan *P. guajava* ini juga turut mempunyai tindakan khusus. Contohnya, ubat Fansidar yang mempunyai bahan aktif susunan pirimetamin dan sulfodoksin. Kedua-dua bahan aktif ini menurut Gatton, Martin dan Cheng (2004) dan Bansal et al. (2017) telah berfungsi sebagai perencat kepada dua enzim penting parasit dalam biosintesis asid folat iaitu *dihydrofolate reductase* (DHFR) dan *dihydropteroate synthetase* (DHPS).

JADUAL 4. Keputusan bacaan  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) ekstrak metanol daun *Psidium guajava* pada setiap peringkat morfologi parasit secara tiga replikasi (N:40)

	Peringkat morfologi	Bacaan $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	Cecincin	$0.1 \pm 0.02$
2	Trofozoit	$4295.75 \pm 82484.57$
3	Skizon	$4275.57 \pm 89444.55$

Apabila penghasilan asid folat ini diganggu menurut Hunter et al. (2003) dan Adibah (2017) secara tidak langsung akan mengganggu pertumbuhan sel, metabolisme termasuk sintesis DNA dan RNA, sekali gus membantutkan pembentukan protein dan asid amino yang lain. Memandangkan ia merupakan gangguan yang ketara ke atas parasit untuk merencatkan pertumbuhannya dalam tubuh badan manusia, maka enzim bagi tujuan pembentukan asid folat sering menjadi sasaran utama kebanyakan ubat termasuklah antimalaria. Selain daripada itu, merujuk kepada kajian lepas juga, pertumbuhan *P. falciparum* didapati akan terganggu sekiranya *digitolurein*, rubiadin-1-metil dan *Damnacanthal* diberikan. Hal ini kerana menurut Kayser, Kiderlen dan Croft (2000), komponen tersebut bersifat sitotoksik.

#### KESIMPULAN

Kesimpulannya, selain heksana, ketiga-tiga pelarut lain berkesan merencatkan parasit *Plasmodium berghei* NK65, tetapi pelarut metanol adalah yang terbaik, bertindak pada peringkat peratusan 10% parasitemia dan berupaya merencatkan semua kitaran hidup sel parasit malaria tetapi lebih berkesan pada peringkat trofozoit matang dan skizon.

#### PENGHARGAAN

Ucapan ribuan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia atas peruntukan geran penyelidikan GUP-UKM-2011-133 kerana telah membiayai penyelidikan ini selama ia dijalankan.

#### RUJUKAN

- Adibah S. Zahari 2017. Study on potential antimalarial agents of *Canarium odontophyllum* leave extract against erythrocytes infected with *Plasmodium berghei* NK 65 using SYBR green-1 fluorescence assay. Tesis. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Akmar-Ishak, S., Fariza-Azmi, F., Syahnaz-Zahari, A. & Fredalina-Basri, D. 2021. *Ex vivo* study of antimalarial activity of *Canarium odontophyllum* leaf extracts against *Plasmodium berghei* NK65. *Microbes Infect Chemother.* 1: e1255.
- Argueta, A. & Cano, L. 1994. *Flora Medicinal Indigena de Mexico*. Mexico: Instituto Nacional Indigenista.
- A-SNAPPNews. 2000. *McCaleb's Traditional Medicine Agenda added to National Plan of Action for Africa*. <http://herbs.org/africa/articles/tradagenda.html>.
- Bansal, D., Acharya, A., Bharti, P. K., Abdelraheem, M. H., Elmalik, A., Abosalah, S., Khan, F.Y., ElKhalifa, M., Kaur, H., Mohapatra, P.K., Sehgal, R., Idris, M.A., Mahanta, J., Singh, N., Babiker, H.A. & Sultan, A.A. 2017. Distribution of mutations associated with antifolate and chloroquine resistance among imported *Plasmodium vivax* in the State of Qatar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97(6): 1797-1803. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0436>
- Coley, P.D. & Barone, J.A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 27: 305-335. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.305>
- Clyde, D.F., Han, C.M. & Huang, Y.S. 1973. Resistance to chloroquine of *Plasmodium falciparum* from Sabah. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67(1): 146.
- Dondero Jr., T.J., Parsons, R.E. & Ponnampalam, J.T. 1976. Studies on the resistance of malaria chloroquine and to a combination of chloroquine and pyrimethamine in Peninsular Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 70(2): 145-148.
- Elufioye, T.O. & Agbedahunsi, J.M. 2004. Antimalaria activities of *Tihtinia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuge* (Rubiaceae) on mice *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* 93(2-3): 167-171.
- Fatin Nabila Shaari & Nur Ain Izzati Mohd Zainudin 2023. *In vitro* and *in vivo* assays of selected plant extracts against fruit rot fungi. *Sains Malaysiana* 52(9): 2545-2557.
- Gallup, J.L., Sachs, J.D. & Mellinger, A.D. 1999. Geography and economic development. *International Regional Science Review* 22(2): 179-232.
- Gatton, M.L., Martin, L.B. & Cheng, Q. 2004. Evolution of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6): 2116-2123.
- Gil-Martin, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Cianciosi, D., Giampieri, F. & Battino, M. 2022. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry* 378: 131918. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>
- Greenwood, B.M., Bojang, K., Whitty, C.J. & Targett, G.A. 2005. Malaria. *Lancet* 365: 1487-1498.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V. & Dias Filho, B.P. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(7): 1027-1031.
- Hunter, W.N., Alphey, M.S., Bond, C.S. & Schuttelkopf, A.W. 2003. Targeting metabolic pathways in microbial pathogens: oxidative stress and anti-folate drug resistance in trypanosomatids. *Biochemical Society Transactions* 31(Pt 3): 607-610.

- Hussain Ali, M., Ibrahim, I., Jasamai, M., Embi, N. & Sidek, H. 2022. Anti-malarial effect of *Momordica charantia* involved modulation of cytokine mediated via GSK3 $\beta$  inhibition in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Jordan Journal of Biological Sciences* 15(3): 523-529. <https://doi.org/10.54319/jjbs/150322>
- Hyde, J.E. 2005. Drug-resistant malaria. *Trends Parasitology* 21(11): 494-498.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. & Croft, S.L. 2000. Natural products as potential antiparasitic drugs. *Studies in Natural Products Chemistry* 26(Part G): 779-848. [www.fuberlin.de/akkayscr/antiparasiticsfromnature.pdf](http://www.fuberlin.de/akkayscr/antiparasiticsfromnature.pdf)
- Kementerian Kesihatan Malaysia. 2013. *Panduan Pengurusan Malaria di Malaysia*. <http://doi.org/10.1017/CB09781107415324.004>
- Kwansa-Bentum, B., Agyeman, K., Larbi-Akor, J., Anyigba, C. & Appiah-Opong, R. 2019. *In vitro* assessment of antiplasmodial activity and cytotoxicity of *Polyalthia longifolia* leaf extracts on *Plasmodium falciparum* strain NF54. *Malaria Research and Treatment* 2019: 6976298. <https://doi.org/10.1155/2019/6976298>
- Lokman, H., Sharifah Roohi, S.W., Zurkunai, Y., Noor Rain, A., Mansor, S.M., Palmer, K., Navaratnam, V. & Mak, J.W. 1996. *Plasmodium falciparum*: increased proportion of severe resistance (RII and RIII) to chloroquine and high rate of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Peninsular Malaysia after two decades. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90(3): 294-297.
- Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C. & Arnason, J.T. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Archives of Medical Research* 25(1): 11-15.
- Makler, M.T. & Hinrichs, D.J. 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 205-210.
- Mohd Fakharul, Z.R.Y. & Hasidah, M.S. 2009. Infeksi *Plasmodium berghei* dan kesannya ke atas pengisyratan MAP kinase eritrosit perumah. *Sains Malaysiana* 38(5): 761-766.
- Montgomery, R. & Eyles, D.E. 1963. Chloroquine resistant falciparum malaria in Malaya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 57(6): 409-416.
- Muhammad Wahizul Haswan Abdul Aziz, Siti Fathiah Masre, Dayang Fredalina Basri & Ahmad Rohi Ghazali. 2022. *Canarium odontophyllum* Miq. (Dabai) leaf phytoextracts and their medicinal properties. *Pertanika Journal of Science and Technology* 30(3): 2115-2125. <https://doi.org/10.47836/pjst.30.3.20>
- Musa Yaacob, Muhamad Ghawas Maarof & Mansor Puteh. 2005. *Penamaan Tumbuhan Ubat dan Beraroma*. Kuala Lumpur: Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia.
- Mutabingwa, T.K. 2005. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Tropica* 95: 305-315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.06.009>
- Naba Jasim Mohammed, Norinsan Kamil Othman, Ahmed Jamal Abdullah Al-Gburi & Rahimi M. Yusop. 2023. Date palm seed extract for mild steel corrosion prevention in HCl medium. *Separations* 10(1): 54. <https://doi.org/10.3390/separations10010054>
- Naseer, S., Hussain, S., Naeem, N., Pervais, M. & Rahman, M. 2018. The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). *Clin. Phytosci.* 4: 32. <https://doi.org/10.1186/s40816-018-0093-8>
- Nor Akmalazura Jani, Nurul Alia Ahmad Azizi & Nurul Iman Aminudin. 2020. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Psidium guajava*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 24(2): 173-178.
- Nwinyi Obinna, C., Chinedu Nwodo, S. & Ajani Olayinka, O. 2008. Evaluation of antibacterial activity of *Psidium guajava* and *Gongronema latifolium*. *Journal of Medicinal Plant Research* 2: 189-192.
- Peng, W.K., Kong, T.F., Ng, C.S., Chen, L., Huang, Y., Bhagat, A.A.S., Nguyen, N-T., Preiser, P.R. & Han, J. 2014. Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis. *Nature Medicine* 20: 1069-1073. <http://doi.org/10.1038/nm.3622>
- Rasoanaivo, P., Ramanitrahasimbola, D., Rafatro, H., Rakotondramanana, D., Robijaona, B., Rakotozafy, A., Ratsimamanga-Urverg, S., Labaïed, M., Grellier, P., Allorge, L., Mambu, L. & Frappier, F. 2004. Screening extracts of Madagascan plants in search of antiplasmodial compounds. *Phytother. Res.* 18(9): 742-747. <https://doi.org/10.1002/ptr.1533>
- Rocha e Silva, L.F., Nogueira, K.L., da Silva Pinto, A.C., Katzin, A.M., Sussmann, R.A.C., Muniz, M.P., de Andrade Neto, V.F., Chaves, F.C.M., Coutinho, J.P., Lima, E.S., Krettli, A.U., Tadei, W.P. & Pohlit, A.M. 2015. *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(6): 3271-3280. <http://doi.org/10.1128/AAC.05012-14>
- Roncalés, M., Vidal, J., Torres, P.A. & Herreros, E. 2015. *In vitro* culture of *Plasmodium falciparum*: Obtention of synchronous asexual erythrocytic stages. *Open Journal of Epidemiology* 5(1): 71-80. <http://doi.org/10.4236/ojepi.2015.51010>
- Safar, H.F., Ali, A.H., Zakaria, N.H., Kamal, N., Hassan, N.I., Agustar, H.K., Talip, N. & Latip, J. (2022). Steroids from *Diplazium esculentum*: Antiplasmodial activity and molecular docking studies to investigate their binding modes. *Tropical Biomedicine* 39(4): 552-558. <https://doi.org/10.47665/tb.39.4.011>
- Singhanetra-Renard, A. 1986. Population movement, socio-economic behavior and the transmission of malaria in northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 17(3): 396-405.

- Siti Balkis Budin, Hawa Ismail & Pek Lian Chong 2013. *Psidium guajava* fruit peel extract reduces oxidative stress of pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats. *Sains Malaysiana* 42(6): 707-713.
- Soni, S., Dhawan, S., Rosen, K.M., Chafel, M., Chisti, A.H. & Hanspal, M. 2005. Characterization of events preceding the release of malaria from the host red blood cell. *Blood Cells Molecular Disease* 35: 201-211.
- Taher, M., Razali, N.F.M., Susanti, D., Atiar Rahman, M.D., Artasasta, M.A. & Zakaria, Z.A. 2022. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Picrasma javanica*: Quassinoids interest. *Sains Malaysiana* 51(3): 757-774. <https://doi.org/10.17576/jsm-2022-5103-10>
- Tay, Z.H. & Chong, K.P. 2016. The potential of papaya leaf extract in controlling *Ganoderma boninense*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 36: 012027. <http://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012027>
- Thurston, J.P. 1953. *Plasmodium berghei*. *Experimental Parasitology* 2(3): 311-332.
- United Nations. 2023. *Malaria: A Disease of Poverty*. Belgium: United Nations.
- Vagapandu, S., Sachdeva, S., Jain, M., Singh, S., Singh, P.P., Lal Kaul, C. & Jain, R. 2004. 8-quinolinalinines conjugated with amino acid are exhibiting potent blood schizontocidal activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12(1): 239-247.
- Visalini, V. 2010. Viabiliti *Plasmodium berghei* yang dipegunkan pada matriks kitosan dan albumin. Tesis. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Wan Saidin, W.A., Jantan, I., Abdul Wahab, S.M., Jalil, J., Mohd Said, M., Yusoff, S.D. & Husain, K. 2023. Pharmacological activities and mechanisms of action of hypophyllanthin: A review. *Frontiers in Pharmacology* 13: 1070557. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1070557>
- World Health Organization (WHO). 2022. *World Malaria Report* Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (WHO). 2019. *Malaria*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (WHO). 2018. *Artemisinin Resistance and Artemisinin-Based Combination Therapy Efficacy*. Geneva: World Health Organization.
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F. & Wang, Q. 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23(4): 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: shafariatul@gmail.com