

# AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK SPONS *Haliclona* sp. ASAL PAPUA

Murtihapsari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNIPA Papua

## ABSTRAK

**Murtihapsari, 2012.** Aktivitas antimalarial ekstrak spons *Haliclona* sp. asal Papua

Penelitian ini menggunakan salah satu spesies spons laut yang berasal dari lokasi terpencil Papua bagian barat. Spesies *Haliclona* sp. (Papuan) memiliki aktivitas penghambatan yang besar terhadap *Plasmodium falciparum*. Kemampuan penghambatan bergantung pada konsentrasi ekstrak. Berdasarkan uji aktivitas antiplasmodium *in vitro*, *Haliclona* sp. (Papuan) yang berasal dari Sorong memperlihatkan potensi yang besar sebagai penghambat kedua strain dengan angka IC<sub>50</sub> yang rendah (0,253 dan 0,226 µg/mL).

**Kata kunci :** Laut, Spons, *Plasmodium*, Antimalaria, *Haliclona*

## ABSTRACT

**Murtihapsari, 2012.** Antiplasmodial Activity of Extract Sponge *Haliclona* sp. From Papuan

This research was based on species of marine sponge from distinctly locations on the western part of Papuan. Specimens *Haliclona* sp. (Papuan) possess a great inhibition against *Plasmodium falciparum*. The inhibition capability seemed depended on extract concentration. On the basis of *in vitro* antiplasmodial activities, *Haliclona* sp. (Papuan) from Sorong showed a high potential as inhibitor for both strain with low IC<sub>50</sub> (0,253 and 0,226 µg/mL).

**Keywords :** Marine, Sponge, *Plasmodium*, Antimalarial, *Haliclona*

## PENDAHULUAN

Resistensi parasit malaria khususnya *Plasmodium falciparum* terhadap beberapa obat yang ada seperti klorokuin, kina dan obat sejenisnya telah menambah masalah baru khususnya bagi wanita hamil yang akan melahirkan bayi prematur, keguguran, mati hingga komplikasi hati dan kekurangan enzim (Ross & Flaningan 2006). Usaha menghasilkan senyawa yang berpotensi sebagai obat antimalaria yang baru semakin mendesak, kebutuhan ini mendorong para peneliti untuk meneliti obat antimalaria dari bahan alami lautan. Menurut Boesri (1994), bahan alam memiliki efek samping sangat kecil karena adanya faktor dari luar yang dapat menetralkan efek samping yang ditimbulkan oleh zat aktif.

Peluang penelitian antimalaria asal biota laut seperti spons di Papua sangat terbuka luas mengingat 50% keanekaragaman sumberdaya hayati laut dan darat Indonesia berada di Papua (Conservation International 2004). Perairan Papua mempunyai laut yang terhubung oleh dua samudera dimana hidup jutaan mikro dan makroorganisme termasuk spons (McCarthy & Pomponi 2004). Selama ini, spons adalah penyumbang terbesar senyawa bioaktif untuk immunsupresif, antivirus, antimalaria, antifouling, antiinflamatori, antibakteri, antitumor dan

bioremediasi (McKenna dkk., 2002; Sipkema dkk., 2004; Jha & Zi-rong 2004; Harvey 2005).

Perairan Papua dan Papua Barat merupakan daerah yang kaya sumberdaya spons laut namun terparah dalam kasus penyakit malaria. Kedua fenomena tersebut yang mendorong penelitian ini untuk menemukan aktivitas antimalaria yang bersumber dari spons laut *Haliclona* sp. yang banyak ditemukan di perairan Papua.

## BAHAN DAN METODE

Bahan utama dalam penelitian ini adalah spons *Haliclona* sp. (Papua) diambil di perairan laut Suprau, Tanjung Kasuari, bagian barat kota Sorong GPS: 0°49'50.89"S- 131°14'2.65"E, Lieberman-Burchard, Dragendorff, Bouchard dan Mayer, protozoa *P. falciparum* galur W2 (resisten) dan D6 (sensitif) yang diperoleh dari US NAMRU-2 Jakarta (US Naval Medical Research Unit Two), Rosewell Parla Memorial Institute (RPMI) 1640 yang mengandung L-glutamin, asam N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etana sulfonat (HEPES), NaHCO<sub>3</sub> 5%, antibiotik gentamisin sulfat injeksi, serum, sel darah merah (RBC) golongan darah O, zat

Korespondensi dialamatkan kepada yang bersangkutan :

<sup>1</sup> Universitas Negeri Papua. Jl. Gunung Salju, Amban, Manokwari, Papua Barat.

Phone : -, E-mail : murtihapsari.kadarusman@yahoo.com

antikoagulan sitrat fosfat dektrosa (CPD), pewarna Giemsa, larutan bufer fosfat pH 7,2.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas untuk ekstraksi, membran Milipore ukuran 0,22 dan 0,45  $\mu\text{m}$ , tabung sentrifuse ukuran 10 dan 50 mL, lampu UV, ruang *Laminar Air Flow*, mikroskop pembesaran 10 x 100 (merk Nikon (Labophot-2) seri 441528 Jepang).

### **Pembuatan Ekstrak**

Spons *Haliclona* sp. (Papua) diambil pada kedalaman 10 m direndam dalam metanol dan disimpan ke dalam *coldstorage* 10 °C dan baru dikeluarkan waktu penelitian dimulai. Spons sebanyak 500 g dipotong-potong halus, kemudian dimaserasi selama 3 kali @24 jam dalam 1000 mL metanol, sambil sekali-kali dikocok sampai filtrat metanol tidak berwarna. Filtrat yang diperoleh disatukan, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kasar lalu dilanjutkan *freeze drying*, ekstrak kasar dipindahkan ke dalam botol-botol kecil dan ditutup rapat. Ekstrak disimpan di dalam lemari pendingin untuk dilakukan uji aktivitas antimalaria dengan konsentrasi 1000, 100, 10, 1, 0,1 dan 0,01  $\mu\text{g/mL}$  (Miyaoaka dkk., 1998; Hanani dkk., 2005).

### **Pemeriksaan Kandungan Kimia Menggunakan Pereaksi Kimia**

Identifikasi kandungan kimia dalam ekstrak dilakukan terhadap senyawa-senyawa (Hanani dkk., 2005; Harborne, 1987) :

1. Steroid/triterpenoid  
Sebanyak 1 mL larutan ekstrak diuapkan sampai kering, kemudian ditambah dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Warna biru-ungu menunjukkan adanya senyawa terpenoid atau steroid.
2. Alkaloid  
Larutan ekstrak sebanyak 3 mL ditambah dengan 1 mL HCl 2 N, dan 6 mL air suling, kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan kemudian disaring. Filtrat diperiksa adanya senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, Bouchard dan Mayer.

### **Uji Antimalaria secara *In Vitro*** (Purwantiningsih 2003; WHO 2008)

Sebelum melakukan uji pertumbuhan *P. falciparum*, pengembangbiakan parasit dilakukan dengan metode Trager dan Jensen melalui tahapan:

#### **Tahap uji *in vitro*** (Purwantiningsih 2003)

Pengujian antimalaria dilakukan dengan menggunakan kultur parasit biakan. Proses

sinkronisasi dipersiapkan dengan cara kultur parasit dari galur resisten (W2) dan galur sensitif (D6) dikumpulkan dari petri ke masing-masing *conical tube* yang telah beri tanda setelah hasil sinkronisasi selama 48 jam. Kultur parasit diambil dengan cara disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm, supernatan dibuang dengan pipet Pasteur steril dan sisa endapan dihitung. Jika endapan terdapat 0,2 gradien maka ditambah dengan media pertumbuhan sampai 10 mL. Pada *conical tube* lain disiapkan RBC 50% (eritrosit tak berparasit) sebanyak 0,4 mL dan ditambahkan media pertumbuhan sampai 10 mL. Slide apusan darah tipis sebelumnya memberikan informasi kadar parasitemia galur W2 dan D6, misalnya parasitemia D6 2%, maka dari *conical tube* yang telah berisi parasit diambil 1 bagian volume dan 1 bagian volume dari *conical tube* tak berparasit, selanjutnya dicampur sampai homogen dan siap dilakukan uji aktivitas antimalaria.

Uji antimalaria dilakukan empat kali ulangan memakai lempeng sumur mikro 96 lubang yang terbagi dalam 12 kolom (1-12) dan 8 baris (A-H). Lempeng sumur mikro dipersiapkan dan lempeng ini hanya sekali dipakai.

#### **Perencanaan konsentrasi** (Purwantiningsih, 2003)

Ekstrak spons yang telah siap, selanjutnya dibuat dengan konsentrasi 1000, 100, 10, 1, 0,1 dan 0,01  $\mu\text{g/mL}$ . Lempeng sumur mikro disiapkan dua buah, baris A, kolom 1-12 diisi sel darah merah non parasit masing-masing 50  $\mu\text{L}$  sedangkan baris B kolom 1-12 berperan sebagai kontrol metanol absolut dimasukkan dalam lempeng sumur mikro dengan pipet Eppendorf masing-masing 50  $\mu\text{L}$  sedangkan ekstrak spons dimasukkan ke dalam lempeng sumur uji 50  $\mu\text{L}$  masing-masing sampel empat kali pengulangan untuk galur W2 dan D6.

Uji lempeng sumur untuk sampel *Haliclona* sp. (Papua) pada galur W2 terdiri dari baris C sampai dengan H, kolom 1,2,3,4 masing-masing diisi dengan konsentrasi larutan ekstrak berturut-turut 1000, 100, 10, 1, 0,1 dan 0,01  $\mu\text{g/mL}$ . Untuk galur D6, ekstrak spons diisi pada lempeng sumur lainnya dengan urutan baris dan kolom yang sama pada galur W2.

Kemudian lempeng sumur mikro yang telah berisi bahan uji dibiarkan terbuka dalam ruang steril (*Laminar Air Flow*) sampai semua pelarut menguap dan di dalam sumur mikro hanya tertinggal zat uji yang menempel pada dinding sumur. Tahap berikutnya, suspensi sel parasit hasil proses sinkronisasi yakni dengan parasitemia awal 0,2-0,8% dan hematokrit 2% dimasukkan ke dalam tiap sumur masing-masing 50  $\mu\text{L}$ . Lempengan sumur mikro ditutup dan digoyangkan secara perlahan supaya bahan uji menyatu dengan suspensi parasit.

Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam diinkubator ke dalam nyala lilin. Bila nyala hampir padam, *candle jar* ditutup sehingga kedap udara.

### Pemanenan dan evaluasi hasil pengujian antimalaria (Purwantiningsih, 2003)

Lempeng sumur mikro dikeluarkan dari inkubator dan *candle jar*. Suspensi bagian atas dibuang  $\pm 20 \mu\text{L}$  sehingga yang tertinggal hanya suspensi yang lebih pekat. Suspensi tersebut diambil dengan pipet Eppendorf selanjutnya diteteskan pada slide uji untuk dibuat slide apusan darah tebal (Gambar 1). Setiap kolom dibuat slide apusan darah tebal sebanyak tiga kali ulangan untuk kontrol dan

$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - [(X_e/X_k) \times 100\%]$$

Keterangan :

$X_e$  = jumlah skizon hidup dengan minimal 3 inti terhadap 200 aseksual *P. falciparum* pada sumur uji

$X_k$  = jumlah skizon hidup dengan minimal 3 inti terhadap 200 aseksual *P. falciparum* pada sumur kontrol

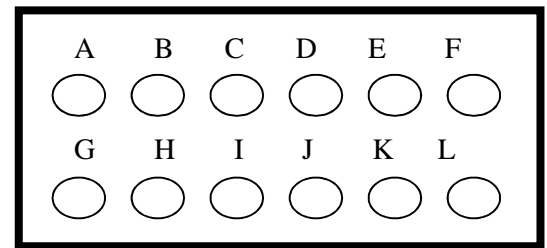
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Spons

Dalam penelitian ini, maserasi dilakukan dengan merendam sampel spons yang dipotong-potong dengan ukuran kecil untuk memudahkan kontak dengan pelarut metanol, dengan demikian semakin banyak senyawa bioaktif yang dapat diekstrak. Maserasi digunakan untuk mengekstraksi sampel yang tidak tahan terhadap panas dan tidak merusak senyawa, hal ini dilakukan untuk memperoleh hasil ekstrak yang maksimal.

Maserasi sampel spons *Haliclona* sp. (Papua) menghasilkan filtrat dengan volume akhir perhitungan kurang lebih 1/10 cairan tersisa dari volume filtrat awal, hingga diperoleh ekstrak kental warna cokelat kehijauan dengan bobot ekstrak 13,678 gram. Kemudian dilakukan pengukuran rendemen dihasilkan 2,736%. Rendemen merupakan perbandingan berat ekstrak yang diperoleh dengan bobot awal sampel (berat basah) yang digunakan. Rendemen menggambarkan efektivitas pelarut tertentu terhadap bahan dalam suatu sistem tetapi tidak menunjukkan tingkat aktivitas ekstrak tersebut. Komponen yang terbawa pada proses ekstraksi adalah komponen yang memiliki polaritas sesuai dengan pelarutnya. Jenis pelarut yang digunakan

untuk masing-masing konsentrasi. Semua slide dikeringkan pada suhu kamar selama 1 hari, diwarnai dengan pewarna Giemsa dan dibiarkan selama 20 menit. Kemudian di cuci secara berhati-hati dengan air mengalir sampai semua larutan Giemsa hilang dan dilanjutkan pengeringan kembali di suhu ruang. Slide tersebut diamati pada mikroskop pembesaran 10x100, lalu dihitung jumlah *ring*, *trophozoit*, *skizon* yang hidup. Persentase kematian dihitung dengan cara membandingkan antara jumlah *skizon* hidup dengan minimal 3 inti terhadap 200 aseksual parasit *P. falciparum*, kemudian perhitungannya dibandingkan dengan kontrol dan dirumuskan sebagai berikut:



Gambar 1 Pola pembuatan slide apusan darah tebal

mempengaruhi jumlah rendemen yang dihasilkan. Rendemen ekstrak metanol (polar) sangat baik, hal ini disebabkan pelarut metanol dapat memecah sel dan mengekstraksi bahan sampai ke bagian dalam sel (Sukardiman dkk., 2002).

Rendemen yang dihasilkan dari proses ekstraksi spons dipengaruhi oleh struktur habitat, kemampuan adaptasi, ketersediaan dan jejaring makanan serta interaksi intra sel spons itu sendiri (Faulkner & Ghiselin 1983; Bernan dkk., 1997). Kandungan senyawa spons laut juga dipengaruhi oleh keadaan substrat dan mikroba asosiatifnya (Suganuma dkk., 1992; Hentschel dkk., 2003). Rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini juga dipengaruhi oleh bobot sampel basah dan jumlah bahan ekstrak kasarnya.

### Pemeriksaan Kandungan Kimia Menggunakan Pereaksi Kimia dan Pengujian Aktivitas Antimalaria

Bioaktivitas spons sangat dipengaruhi oleh kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam bahan, perbedaan kandungan senyawa kimia menentukan aktivitas farmakologis spons tersebut. Hasil uji pemeriksaan kandungan kimia menggunakan pereaksi kimia ekstrak spons disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji pemeriksaan kandungan kimia ekstrak menggunakan pereaksi kimia

Senyawa	Sampel <i>Haliclona</i> sp. (Papua)	Warna (awal → akhir)
Alkaloid	++++	putih → jingga/cokelat
Steroid	+	putih → biru
Triterpenoid	++	putih → merah/ungu

Keterangan : (-): Negatif (tidak terdeteksi); (+): Positif lemah; (++) : Positif; (+++) : Positif kuat; (++++): Positif sangat kuat

Hasil uji pemeriksaan kandungan kimia menggunakan pereaksi kimia ekstrak spons pada Tabel 1 menunjukkan bahwa secara umum sampel spons yang diuji mengandung senyawa kimia metabolit sekunder golongan alkaloid, steroid, dan triterpenoid.

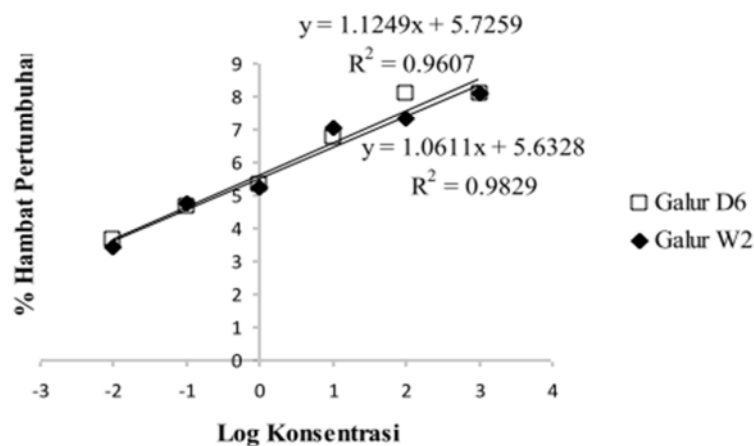
Sampel spons *Haliclona* sp. (Papua), memiliki senyawa alkaloid yang lebih dominan daripada steroid dan triterpenoid. Hasil yang sama juga didapatkan senyawa triterpenoid berupa pentasiklik sulfat hidrokuinon banyak ditemukan dari spons *Haliclona* sp. asal perairan pulau Phuket Thailand (Bokesch dkk., 2002).

Uji antimalaria pada tahap maserasi dari ekstrak uji *Haliclona* sp. (Papua) menggunakan berbagai konsentrasi larutan uji (1000, 100, 10, 1, 0,1 dan 0,01 µg/mL). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan uji yang digunakan akan menghasilkan efek penghambatan *P. falciparum* yang semakin tinggi pula hingga 100% (Gambar 2).

Tabel 2 Nilai IC<sub>50</sub> tiap spesimen dari dua galur W2 dan D6

Jenis spesimen	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	W2	D6
<i>Haliclona</i> sp. (Papua)	0,253	0,226

Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin dari berbagai konsentrasi dengan *P. falciparum* galur resisten (W2) dan sensitif (D6). Bahan ini merupakan hasil pengembangbiakan kultur laboratorium US. NAMRU-2 Jakarta. Sampai saat ini, klorokuin masih digunakan di beberapa daerah sebagai obat untuk menangani serangan malaria walaupun sudah tidak direkomendasikan (Savarino 2003; Plowe 2005; Martin 2009). Data kontrol positif klorokuin dari galur W2 (resisten) dan D6 (sensitif) merupakan data sekunder dari US. NAMRU-2 Jakarta.



Gambar 2. Persen penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* galur W2 dan D6 dari hasil ekstrak tiga spesimen *Haliclona* sp. (Papua)

Spesimen yang diuji (Tabel 2 dan Gambar 2), spons *Haliclona* sp. (Papua) memiliki nilai IC<sub>50</sub> dengan kontrol klorokuin dengan perbandingan galur W2 (0,253 berbanding 3,111 µg/mL) dan galur D6

(0,226 berbanding 0,013 µg/mL). Dalam konteks laju penghambatan parasit, semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> suatu bahan uji berarti memiliki potensi daya hambat yang besar terhadap *P. falciparum* (Wet 2005; Zhang &

Rathod 2002). Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Opsenica dkk. (2004), tetraoksan dengan ekstrak spons *haliclona* sp. menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> galur W2 (resisten) dan D6 lebih rendah (0,002 berbanding 0,253 µg/mL) dan nilai galur D6 (sensitif) yang sangat rendah pula (0,005 berbanding 0,226 µg/mL). Selain itu, komparasi dengan penelitian Sathe dkk. (2008) yang mensintesis dan mengevaluasi antimalaria dari asam β-amino siklik yang mengandung dipeptida dengan jenis malaria yang sama, menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> galur W2 (0,024 berbanding 0,253 µg/mL) sedangkan galur D6 (0,038 berbanding 0,226 µg/mL).

## KESIMPULAN

Ekstrak spons laut *Haliclona* sp. (Papua) menggunakan pelarut metanol dihasilkan bobot ekstrak 13,678 gram dengan rendemen 2,736%. Pada uji kualitatif pemeriksaan kandungan kimia senyawa alkaloid lebih dominan dibanding steroid dan triterpenoid. Spons *Haliclona* sp. memiliki aktivitas antimalaria karena dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dengan nilai IC<sub>50</sub> lebih kecil untuk galur resisten dari kontrol klorokuin

## DAFTAR PUSTAKA

- Bernan VE., Greenstein M., Maiese WM. 1997. Marine microorganism as a source of new natural products. Academic press. New York.
- Boesri H. 1994. Pemanfaatan Tanaman dalam Penanggulangan Malaria. Media Litbangkes. Vol. 4 (01).
- Bokesch HR., Stull AC, Pannell LK., McKee TR. 2002. A New pentacyclic sulfated hydroquinone from the marine sponge *Haliclona* sp. . *Tetrahedron Letters*. Vol. 43, Issue 16. 3079-3081.
- Conservation International. 2004. Freshwater Biotas of New Guinea and Nearby island: analysis of endemism, richness, and threats. Survey Report No. 004. Washington, D.C. pp 1-46.
- Faulkner DJ & Ghiselin MT. 1983. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Marine ecology progress series*. Oldendorf pres. Germany.
- Hanani E., Mun'im A., Sekarini R. 2005. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *calyspongia* sp dari kepulauan seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II, No.3, 127 – 133.
- Harborne. 1987. Metode Fitokimia. Edisi kedua. Patmawinata K. Soediro I. Penerjemah. Terjemahan dari: Phytochemical methods. Bandung: ITB.
- Harvey A. 2005. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today*; 5, 294-300.
- Hentschel L., Fieselern M., Wehri C, Gernert C, Steiner M, Hacker J, Horn M. 2003. Microbial Diversity of Marine Sponges, Springer.
- Jha RK & Zi-rong X. 2004 . Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs*; 2, 123-1462.
- Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI. 2009. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* 325(5948): 2.
- McCarthy PJ. & Pomponi SA. 2004. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. *Marine Biomed. Res*, 1-2.
- McKenna SA., Allen GR., Suer Suryadi. 2002. A Marine Rapid Assessment of the Raja Ampat Islands. Conservation International. Washington DC.
- Miyaoka H, Shimomura M, Kimura H, Yamada Y. 1998. Antimalarial Activity of Kalihinol A and New Relative Diterpenoids from the Okinawan Sponge, *Acanthella* sp. *Tetrahedron*. 13467-13474.
- Opsenica I., Terzic N., Opsenica D., Milhous KW., Solaja B. 2004. 7,8,15,16-tetraoxo-dispiro[5.2.5.2]hexadecane-3-carboxylic acid derivatives and their antimalarial activity. Preliminary Communication. *J. Serb. Chem. Soc.* 69 (11) 919–922.
- Plowe CV. 2005. Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295: 55–79.
- Purwantiningsih. 2003. Artemisinin dari *Artemisia sacrorum*, Ledeb dan Turunannya sebagai Komponen Bioaktif Antimalaria. [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ross & Flaningan. 2006. Antimalaria drug. [www.healthatoz.com](http://www.healthatoz.com). [1 Januari 2010]
- Sathe M., Thavaselvam D., Srivastava AK., Kaushik MP. 2008. Synthesis and Antimalarial Evaluation of Cyclic β-Amino Acid-Containing Dipeptides.
- Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. 2003. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *Lancet Infect Dis* 3 (11): 722.
- Sipkema D., Snijders APL., Schroen CGPH., Osinga R., Wijffels R. 2004. The life and death of sponge cells. *Biotechnol. Bioeng.* 85(3): 239–247.
- Sukardiman, Poerwono H., Mubarika S., Sismindari. 2002. Skrining aktivitas antikanker fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol dan ekstrak metanol benalu the (*Scurula krthopurpurea*) dengan molekul target enzim DNA topoisomerase. *Majalah Farmasi Airlangga* 2:72-75 [17 Februari 2010]
- Suganuma M., Fujiki H., Okabe S., Nishiwaki. 1992. Structurally different members of the okadaic acid class selectively inhibit protein serine/threonine but not tyrosine phosphatase activity. *Toxicon*. Vol.27. 110-131.
- Wet DH. 2005. An Ethnobotanical and Chemataxonomix Study of South African *Menispermaceae*. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree Philosophiae Doctor in Botany in the Faculty of Science at the at the University of Johannesburg.

WHO (World Health Organization). 2008. In Vitro Micro-test (Mark III) For The Assessment of The Response of *Plasmodium falciparum* to Chloroquin, Mefloquine, Quinine, Amodiaquine, Sulfadoxine/Pyrimethamine and Artemisinin. Division of Control of Tropical Diseases.

Zhang K. & Rathod PK. 2002. Divergent Regulation of Dihydrofolate Reductase Between Malaria Parasite and Human Host. *Science*. Vol. 296. no. 5567, pp. 545 – 547.