

PLASMODIUM BERGHEI

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN PROVITAMIN B5
PADA PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei*
INTRAERITROSITER DAN KADAR GSH ERITROSIT
MENCIT BALB/C YANG TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

KKA
KK
TKD 11/07

Eka
P



ARDIANA EKAWANTI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



**PENGARUH PEMBERIAN PROVITAMIN B5 PADA PERTUMBUHAN
Plasmodium berghei INTRAERITROSITER DAN KADAR GSH
ERITROSIT MENCIT BALB/C YANG TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar

Oleh :

**ARDIANA EKAWANTI
NIM. 090415335 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Nopember 2006**

HALAMAN PERSETUJUAN UJIAN TESIS

Lembar pengesahan


TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL,.....

Oleh :
Pembimbing Ketua,



Prof. Dr. dr. Indri Safitri, MS
NIP.130 933 211

Pembimbing,



Sutji Kuswarini, dr., M.Kes.
NIP. 131 406 059

Mengetahui:
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya,



Prof. dr. Retno Handajani, MS., Ph.D.
NIP. 130 541 984

HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Telah diuji pada

Tanggal 28 Nopember 2006

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. dr. Retno Handajani, MS., PhD.

Anggota :

1. Prof. Dr.dr. Indri Safitri, MS.
2. Sutji Kuswarini, dr., M.Kes.
3. Dra. Aty Widiawaruyanti, MS. Apt.
4. Dr. Hari Basuki N., dr., M.Kes.
5. Prof. Dr.dr. Harianto Notopuro, MS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah *SWT* yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala Rahmat dan KaruniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof.Dr.dr.Indri Safitri, MS. Pembimbing Ketua sekaligus dosen Penasehat Akademik selama mengikuti Program Magister Ilmu Kedokteran Dasar minat studi Ilmu Biokimia yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran serta sebagai sumber inspirasi selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih saya ucapkan kepada dr. Sutji Kuswarini, M.Kes. Pembimbing yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran serta inspirasi selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah republik Indonesia cq. Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan Beasiswa Program Pascasarjana (BPPS), sehingga menunjang studi saya di program Magister ilmu Kedokteran Dasar dengan minat studi Ilmu Biokimia di di Universitas Airlangga.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasichul Lisan, Drs., Apt., maupun kepada mantan rektor Prof.Dr. Med. Puruhito,dr.,SpBTKV atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk megikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister di Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Mataram Prof. Mansur Ma'shum, Ph.D atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr. beserta Asisten Direktur dan stafnya di lingkungan Program Pascasarjana atas segala fasilitas dan bantuan selama mahasiswa program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program Magister di Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Mataram, Prof. Dr. Mulyanto, dr. atas bantuan yang diberikan selama saya selama mengikuti program pendidikan Magister di universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Airlangga Prof. Dr. Retno Handayani., MS.,PhD., atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program Magister di Universitas Airlangga.

Ketua Minat Studi Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. dr. Indri Safitri, MS. atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program Magister di Universitas Airlangga.

Ketua Laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama menyelesaikan penelitian tesis. Terima kasih yang sebesar – besarnya juga saya sampaikan kepada Dra. Aty Widiawaruyanti, Msi. yang telah memberikan ilmu, bantuan dan saran selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Ketua Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta staf, atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama menyelesaikan penelitian tesis selama ini.

Kepada Tim Tenguji Tesis, yang banyak memberikan masukan, saran dalam penyempurnaan tesis ini.

Para Dosen program Pascasarjana Universitas Airlangga, atas ilmu, bimbingan, dorongan maupun saran yang diberikan kepada saya.

Kedua orang tua tercinta, Ir. Sanisah, SU dan Ibunda Aminah yang selalu memberikan dorongan dan do'a agar tetap sehat dan sukses dalam menggapai cita-cita, dan kepadanya saya sampaikan ucapan terima kasih dan do'a semoga Allah selalu memberikan kesehatan dan panjang umur dan semoga kebaikannya di terima Allah SWT. Disamping itu saya juga mengucapkan terima kasih kepada keluarga tercinta; suami tercinta Muhaimin SH.M. Hum., anak-anak tercinta Muhammad Abdurrosyid dan Muhammad Abdurrohman yang telah memberikan dorongan semangat serta pengertian yang besar selama saya mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Mereka yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, atas bantuan dan kerja sama yang telah diberikan selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Akhir kata, semoga Allah SWT. Tuhan yang Maha Esa membalas semua kebaikan ini, serta selalu melimpahkan Rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. Aamiin.

Surabaya, Nopember 2006
Hormat kami,

Penulis

RINGKASAN

**PENGARUH PEMBERIAN PROVITAMIN B5 PADA PERTUMBUHAN
Plasmodium berghei INTRAERITROSITER DAN KADAR GSH
ERITROSIT MENCIT BALB/C YANG TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

Meningkatnya resistensi obat antimalaria adalah salah satu hambatan dalam penanganan penyakit malaria, sehingga perlu mencari senyawa baru antimalaria. Provitamin B5 adalah senyawa yang bisa menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* sebagai penyebab kematian tertinggi. Provitamin B5 bekerja sebagai inhibitor kompetitif pada enzim pantotenat kinase sehingga fosforilasi asam pantotenat untuk pembentukan KoA tidak terjadi. Provitamin B5 juga meningkatkan kadar GSH sel eritrosit, yang bisa mempengaruhi pertumbuhan parasit.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian provitamin B5 terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* intraeritrositer dan kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

Penelitian ini menggunakan infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit sebagai model infeksi *Plasmodium falciparum* pada manusia. Mencit Balb/C jantan sebanyak 24 ekor dipilih secara random, dibagi menjadi tiga kelompok : kelompok kontrol, kelompok P1 dan kelompok P2, masing-masing mencit dalam kelompok diinfeksi dengan 10^6 *Plasmodium berghei* dalam 200 μ L darah mencit donor. Pada kelompok P1 dan P2 masing-masing diberi provitamin B5 sebanyak 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peronde, sedangkan kelompok kontrol hanya diberi aquades peronde sebanyak 400 μ L. Pemberian provitamin B5

mengikuti protokol yang terdapat pada *the 4-days suppressive test of blood schizontocidal action*. Pemeriksaan parasitemia dilakukan sebelum perlakuan (D0) dan sesudah perlakuan (D4), pada hari keempat dilakukan terminasi untuk pengambilan darah intrakardial yang akan digunakan untuk pemeriksaan GSH sel eritrosit dengan menggunakan metode Anderson. Penimbangan berat badan dilakukan setiap hari sebelum perlakuan untuk penyesuaian dosis.

Hasil yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan *Anova*, yang dilanjutkan *LSD* jika didapatkan beda yang bermakna pada $\alpha = 0,05$. Pemeriksaan parasitemia menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan parasit yang bermakna pada kelompok P1 (60,57 %) ($p=0,000$). Kadar GSH sel eritrosit pada kelompok P2 lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok P1 ($p=0,010$).

Kesimpulan penelitian ini adalah terjadi hambatan pertumbuhan parasit pada pemberian provitamin B5 sebanyak 1,4 g/kgBB/hari, sedangkan pada dosis 5,6 g/kgBB/hari tidak terjadi hambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* pada pemberian provitamin B5 sebanyak 5,6 g/kgBB/hari lebih tinggi dibandingkan kontrol, sedangkan kadar GSH sel eritrosit pada pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

SUMMARY

THE INFLUENCES OF PROVITAMIN B5 ON INTRAERYTHROCYTE GROWTH OF *Plasmodium berghei* AND ERYTHROCYTE GSH LEVEL OF *Plasmodium berghei* INFECTED BALB/C MICE

Increasing in antimalaria resistance inhibited malaria eradication, so that, the effort of finding new antimalaria drugs is needed. Provitamin B5 could inhibit the growth of *Plasmodium falciparum* as the agent causing high mortality rate. The action of provitamin B5 is being the competitive inhibitor of pantothenate kinases, the enzyme catalyzed pantothenic acid phosphorylation, first reaction in CoA biosynthesis. So that, the existence of provitamin B5 will interfere the metabolism and the growth of parasite. Provitamin B5 also increased erythrocyte GSH level, that could influence the growth of parasite.

The objective of this study was to find out the influences of provitamin B5 on the growth of *Plasmodium berghei* intraerythrocyte and the level of erythrocyte GSH of *Plasmodium berghei* infected Balb/C mice.

This study conducted the *Plasmodium berghei* research model of *Plasmodium falciparum* infected human. As many as 24 males Balb/C mice were separated randomly into three groups, namely control group, group P1 and group P2. As soon as parasitaemia reached 1–5 % the treatment should begin. Control group was administered 400 µL aquades by gavage, group P1 administered 1.4 g/kgBW/day of provitamin B5 and group P2 administered 5.6 g/kgBW/day of provitamin B5 and all treatment by gavage. Provitamin B5 treatment followed the protocol in the 4-days suppressive test of blood schizontocidal action. Parasitaemia were measured at the first day before treatment (D0) and the end of

treatment before terminated the mice (D4). On the fourth day, the mice were terminated and blood samples from intracardiac was taken. Thus, blood samples conducted erythrocyte GSH measurement followed Anderson method.

The results were analysed by using Anova $\alpha = 0.05$, and continued by LSD if the result showed a significant difference. Parasitaemia measurement showed a significant inhibition of the growth of the parasites in group P1 (60.57 %) ($p=0.000$), while in group P2 no significant difference from control group ($p=0.801$). Erythrocyte GSH level decreased in all groups compared to normal value of erythrocyte GSH. Erythrocyte GSH in group P2 increased significant difference compared to group P1 ($p=0.010$).

It is concluded that there is inhibition of the growth of parasites in provitamin B5 treatment at the dose of 1.4 g/kgBW/day, while at the dose of 5.6 g/kgBW/day no inhibition compare to control group. Erythrocyte GSH level increased in Plasmodium infected Balb/C mice administered 5.6 g/kgBW/day of provitamin B5, while the dose 1.4 g/kgBW/day decrease compare to control group.

ABSTRACT

THE INFLUENCES OF PROVITAMIN B5 ON INTRAERYTHROCYTE
GROWTH OF *Plasmodium berghei* AND ERYTHROCYTE GSH LEVEL
OF *Plasmodium berghei* INFECTED BALB/C MICE

Abstract. Provitamin B5 was the competitive inhibitor of pantothenate kinase-the enzyme needed in pantothenic acid phosphorylation, while the pantothenic acid was the essential nutrition needed in the growth of parasite. Provitamin B5 treatment would inhibit the growth of parasite and increased erythrocyte GSH level. The objective of this study was to find out parasitaemia level and erythrocyte GSH level due to provitamin B5 treatment to *Plasmodium berghei* infected Balb/C mice.

Method. 24 males Balb/C mice were infected by 200 μ L blood which contain 10^6 *Plasmodium berghei* intraperitoneally. Then, samples were separated randomly into three groups, namely control group, group P1 and group P2. As soon as parasitemia reached 1–5 % the treatment should begin. Control group was administered 400 μ L aquades by gavage, group P1 administered 1.4 g/kgBW/day of provitamin B5, group P2 administered 5.6 g/kgBW/day of provitamin B5, and all treatment by gavage. Provitamin B5 treatment followed the protocol in the 4-days suppressive test of blood schizontocidal action. On the fourth day the mice were terminated and blood samples from intracardiac was taken. Thus, blood samples conducted erythrocyte GSH measurement followed Anderson method.

Result. The results were analysed by using Anova $\alpha = 0.05$, and continued by LSD if the result showed a significant difference. Parasitaemia measurement using Percent method showed a significant decrease in group P1 (60.57 %) ($p=0.000$), while in group P2 no significant difference from control group. Erythrocyte GSH level decreased in all groups. Erythrocyte GSH in group P2 increased significant compared to group P1 ($p=0.010$).

Conclusion. Provitamin B5 inhibit the growth of parasites at the dose of 1.4 g/kgBW/day, but there is no inhibition at the dose of 5.6 g/kgBB/day. Provitamin B5 increased erythrocyte GSH level at the dose 5.6 g/kgBW/day, but decreased at the dose of 1.4 g/kgBW/day.

Keywords : Provitamin B5, Parasitaemia, Glutathione (GSH).

DAFTAR ISI

Sampul Depan.....	
Sampul Dalam.....	
Prasyarat Gelar.....	ii
Persetujuan.....	iii
Penetapan Panitia Penguji.....	iv
Ucapan Terima Kasih.....	v
Ringkasan.....	viii
Summary.....	x
Abstract.....	xii
Daftar Isi.....	xiv
Daftar Bagan.....	xvii
Daftar Tabel.....	xviii
Daftar Gambar.....	xix
Daftar Lampiran.....	xx
Daftar Singkatan.....	xxi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan umum.....	5
1.3.2. Tujuan khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Malaria.....	7
2.1.1. Permasalahan malaria.....	7
2.1.2. Morfologi dan siklus hidup plasmodium.....	9
2.1.3. <i>Plasmodium berghei</i>	11
2.1.3.1. Karakteristik <i>Plasmodium berghei</i>	11
2.1.3.2. Siklus <i>Plasmodium berghei</i>	13
2.1.4. Gejala klinis malaria.....	15
2.1.5. Diagnosis malaria.....	18
2.2. Provitamin B5.....	25
2.3. Glutathione (GSH).....	28
2.4. Peranan Provitamin B5 dalam Menghambat Pertumbuhan Parasit Malaria.....	31
2.5. Pengujian Provitamin B5 sebagai Antimalaria.....	38

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	40
3.1. Kerangka Konseptual	40
3.2. Hipotesis Penelitian.....	43
 BAB 4. MATERI DAN METODE PENELITIAN	 44
4.1. Rancangan Penelitian.....	44
4.2. Unit eksperimen, Randomisasi dan Replikasi.....	45
4.2.1. Unit eksperimen.....	45
4.2.2. Randomisasi.....	46
4.2.3. Replikasi.....	46
4.3. Variabel Penelitian.....	47
4.3.1. Klasifikasi variabel.....	47
4.3.2. Definisi operasional.....	47
4.4. Bahan Penelitian.....	48
4.4.1. Hewan uji.....	48
4.4.2. Bahan untuk perlakuan.....	48
4.4.3. Bahan untuk pemeriksaan.....	49
4.5. Instrumen Penelitian.....	49
4.5.1. Instrumen untuk perlakuan.....	49
4.5.2. Instrumen untuk pemeriksaan.....	50
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	50
4.6.1. Tempat penelitian.....	50
4.6.2. Waktu penelitian.....	50
4.7. Prosedur Penelitian.....	51
4.7.1. Aklimatisasi.....	51
4.7.2. Penginfeksi <i>Plasmodium berghei</i>	51
4.7.3. Perlakuan pemberian provitamin B5.....	52
4.7.4. Pemeriksaan parasitemia.....	52
4.7.5. Pemeriksaan GSH eritrosit.....	53
4.8. Analisis Data.....	54
4.9. Kerangka Operasional Penelitian.....	55
 BAB 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	 56
5.1. Data Berat Badan antar Kelompok Perlakuan.....	56
5.2. Data Parasitemia.....	56
5.3. Data Kadar GSH Sel Eritrosit.....	62

BAB 6. PEMBAHASAN.....	63
BAB 7. PENUTUP.....	73
7.1. Kesimpulan.....	73
7.2. Saran.....	74
DAFTAR PUSTAKA.....	75

Daftar Bagan

Bagan. 3.1. Bagan kerangka konseptual	42
4.1. Bagan kerangka operasional penelitian	55

Daftar Tabel

	Halaman
Tabel 2.1. Gambaran isolat, inang dan vektor.....	12
2.2. Perbedaan karakteristik <i>Plasmodium berghei</i> dengan Plasmodium yang menginfeksi manusia	12
2.3. Karakteristik Plasmodium yang menginfeksi manusia	20
2.4. Gambaran mikroskopis sel yang terinfeksi.....	21
2.5. Perbandingan ketiga jenis RDT	23
5.1. Data berat badan antar kelompok perlakuan.....	56
5.2. Parasitemia sebelum perlakuan (D0).....	60
5.3. Parasitemia sesudah perlakuan (D4)	60
5.4. Persentase pertumbuhan parasit.....	61
5.5. Hambatan pertumbuhan parasit.....	61
5.6. Hasil pengukuran kadar GSH eritrosit mencit Balb/C.....	62

Daftar Gambar

	Halaman
Gambar 2.1. Siklus hidup <i>Plasmodium falciparum</i>	10
2.2. Gambaran mikroskopis <i>Plasmodium berghei</i>	14
2.3. Infeksi lebih dari satu parasit dalam eritrosit	14
2.4. Perkembangan parasit pada siklus eritrositik	15
2.5. Tetes tebal <i>Plasmodium falciparum</i>	19
2.6 Hapusan darah <i>Plasmodium falciparum</i>	19
2.7 Struktur kimia provitamin B5.....	25
2.8 Sintesis KoA dari asam pantotenat	27
2.9 Struktur GSH dan GSSG	28
2.10. Siklus redoks GSH	29
2.11. Digesti hemoglobin dan pembentukan ferriprotoporfirin IX.....	35
2.12. Skema umum berbagai proses biokimiawi antioksidan parasit malaria	36
5.1. Parasitemia kelompok kontrol	57
5.2 .Parasitemia kelompok P1	58
5.3 .Parasitemia kelompok P2.....	59
5.4. Histogram dosis terhadap parasitemia dan GSH.....	62

Daftar Lampiran

Lampiran 1. Penelitian Pendahuluan 81

2. Prosedur Penginfeksi Mencit dengan *Plasmodium berghei*... 84

3. Prosedur Pemberian Provitamin B5 85

4. Perhitungan Dosis Provitamin B5..... 86

5. Prosedur Pembuatan Tetes Tebal, Hapusan darah dan
Pewarnaannya dengan *Giemsa* 87

6. Pemeriksaan GSH Sel Eritrosit 88

7. Pemeriksaan Hemoglobin..... 90

8. Hasil Penelitian dan Analisis Hasil Penelitian..... 91

9. Jadwal Kegiatan Penelitian 101

DAFTAR SINGKATAN

ACP	: <i>Acyl Carrier Protein</i>
GDP	: <i>Gross Domestic Product</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
GSSG	: <i>Glutathione disulfide</i>
HMP Shunt	: <i>Hexose Mono Phosphate Shunt</i>
KoA	: <i>Koenzim A</i>
NADH	: <i>Nicotinamide Adenin Dinucleotide (Reduced)</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenin Dinucleotide Phosphate (Reduced)</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SOR	: <i>Senyawa Oksigen Reaktif</i>
RDT	: <i>Rapid Diagnostic Test</i>
QBC	: <i>Quantitative Buffy Coat Test</i>
PfHRP2	: <i>Plasmodium falciparum Histidine Rich Protein 2</i>
PMA	: <i>Pan Malarial Antigen</i>
pLDH	: <i>Plasmodium Lactate Dehydrogenase</i>
Nipura	: <i>Nilai Pukul Rata</i>

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang**

Penyakit infeksi masih merupakan persoalan yang besar untuk kesehatan masyarakat di negara yang sedang berkembang. Salah satu penyakit infeksi yang menjadi masalah adalah malaria, yang merupakan penyakit endemik di 105 negara. Malaria menyebabkan 300-500 juta kasus klinis dan lebih dari satu juta kematian setiap tahun. Penyebab malaria pada manusia adalah *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* dan *Plasmodium ovale*, di antara penyebab tersebut yang menyebabkan gejala klinis paling berat dan angka kematian yang paling tinggi adalah *Plasmodium falciparum* (WHO, 2002; WHO, 2005; White, 1991).

Di Indonesia, malaria termasuk dalam 10 penyakit utama penyebab kematian dan merupakan penyakit yang muncul kembali (*reemerging disease*) terutama di Jawa dan Bali, walaupun kedua wilayah ini dinyatakan bebas malaria sejak tahun 1970. Angka kejadian malaria yang disebabkan karena infeksi *Plasmodium falciparum* di Jawa dan Bali tahun 2003 tercatat 12957 dan 48 orang di antaranya meninggal. Angka kejadian malaria karena infeksi *Plasmodium falciparum* di luar Jawa dan Bali tahun 2003 tercatat 44.808 dan 211 orang meninggal. Kecenderungan ini terus meningkat dengan meningkatnya mobilitas penduduk dan perubahan lingkungan (Depkes, 2003; WHO, 2005).

Pengendalian penyakit malaria di negara berkembang masih menjadi masalah, karena pelayanan kesehatan yang kurang memadai dan kondisi sosial



ekonomi yang rendah. Masalah ini menjadi semakin kompleks dengan meluasnya resistensi obat antimalaria pada manusia, belum ditemukan vaksin antimalaria dan meningkatnya resistensi nyamuk terhadap insektisida (WHO, 2005; Tanneur, 2005). Salah satu cara mengatasi adalah usaha untuk menemukan senyawa baru yang dapat menghambat perkembangan parasit malaria (Saliba, 2004).

Beratnya gejala klinis yang ditimbulkan oleh malaria karena infeksi *Plasmodium falciparum* dan dasar pengembangan obat antimalaria berkaitan dengan siklus hidup dari parasit malaria. Fase eritrositik *Plasmodium falciparum* menjadi salah satu target intervensi pemberian obat antimalaria (White, 1991). Gejala klinis yang berat pada malaria karena infeksi *Plasmodium falciparum* misalnya malaria serebral terjadi karena invasi parasit ke dalam eritrosit. Pengurangan invasi eritrosit oleh *Plasmodium* dan terhambatnya pertumbuhan parasit, menyebabkan gejala klinis yang terjadi akan ringan dan tidak sampai mengakibatkan kematian (Knirsh, 2003).

Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* di dalam eritrosit inang memerlukan beberapa nutrisi esensial yang berasal dari medium ekstraselular. Salah satu nutrisi esensial tersebut adalah asam pantotenat, suatu vitamin yang larut dalam air, yang merupakan prekursor KoA (Saliba, 1998). KoA adalah kofaktor yang esensial di dalam reaksi metabolik dan reaksi yang menghasilkan energi dan termasuk salah satu pengatur enzim metabolik (Abiko, 1975). KoA juga merupakan sumber 4' fosfopantetein yang dibutuhkan oleh beberapa jalur biosintetik, di antaranya sintesis asam lemak dan poliketida (Kleinkauf, 2000). Asam pantotenat juga merupakan suatu komponen prebiotik (Miller dan Schlesinger, 1993). Kemampuan sebagai prebiotik tersebut dan peranan

pentingnya dalam metabolisme menunjukkan bahwa senyawa ini selalu didapatkan pada fase awal kehidupan organisme (Genschel, 2004). Pemberian provitamin B5 meningkatkan kadar *glutathione* (GSH) pada jurkat sel yang memberikan perlindungan pada sel tersebut dari kerusakan akibat radikal bebas (Slysenchov, 2003). Hasil digesti hemoglobin oleh plasmodium yang berupa heme bebas, bersifat toksik terhadap membran eritrosit. Heme bebas ini akan dinetralisir oleh GSH menjadi pigmen malaria atau hemozoin (Ginsburg, 2004; Tiley, 2001).

Eritrosit yang tidak terinfeksi tidak permeabel terhadap asam pantotenat. Asam pantotenat tersebut dapat masuk ke dalam sel yang terinfeksi melalui suatu jalur transport dalam membran sel eritrosit yang diinduksi oleh parasit intraselular. Pantotenat mengalami fosforilasi sebagai langkah awal pembentukan KoA di dalam sel parasit (Saliba, 1998). Analisis biokimia terhadap eritrosit bebek yang terinfeksi *Plasmodium gallinaceum* didapatkan bahwa eritrosit bebek memiliki seluruh enzim yang diperlukan untuk sintesis KoA. Parasit tidak mempunyai enzim untuk sintesis KoA, sehingga parasit mengambil prekursor KoA dari sel inang. Provitamin B5 merupakan senyawa yang menghambat fosforilasi asam pantotenat dengan menjadi inhibitor kompetitif terhadap enzim pantotenat kinase, sehingga pembentukan KoA tersebut tidak terjadi (Saliba, 2004).

Berdasarkan latar belakang di atas, diketahui bahwa potensi provitamin B5 sebagai antimalaria sangat besar, akan tetapi penelitian tentang hal tersebut masih sedikit dan belum dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, akan diteliti apakah pemberian provitamin B5 peroral dapat menghambat pertumbuhan parasit

Plasmodium berghei intraeritrositer yang diinfeksi kepada mencit Balb/C dan meningkatkan kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C yang terinfeksi oleh *Plasmodium berghei*.

Penelitian ini menggunakan mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* sebagai model infeksi oleh *Plasmodium falciparum* pada manusia. Infeksi mencit Balb/C oleh *Plasmodium berghei* mempunyai persamaan secara biologis dan biokimiawi dengan infeksi *Plasmodium falciparum* pada manusia (LUMC, 2005). Pada penelitian ini mencit Balb/C diberikan provitamin B5 dengan dosis yang sesuai dengan dosis provitamin B5 dalam penelitian Saliba (2004), yaitu 1,4 g/kgBB/hari dan dosis yang lebih besar dari dosis tersebut, yaitu 5,6 g/kgBB/hari.

Untuk menentukan kadar GSH digunakan sel eritrosit, karena eritrosit adalah sel yang menjadi tempat perkembangan *Plasmodium* dan tempat metabolisme parasit. Salah satu metabolisme yang penting adalah metabolisme hemoglobin sel inang yang menghasilkan heme bebas yang toksik dan membutuhkan GSH untuk menetralsirnya (Ullman, 2005; Ginsburg, 2004). Proses ini tentunya akan mempengaruhi kadar GSH sel eritrosit karena sel eritrosit tidak berinti dan tidak memiliki organel sel, sehingga bila kadar GSH menurun tidak dapat disintesis lagi (Baynes&Dominickzak, 2003).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang penelitian di atas, maka dirumuskan masalah yang akan diteliti adalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peroral pada mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* intraeritrositer?
2. Apakah pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peroral pada mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* meningkatkan kadar GSH sel eritrosit?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui potensi provitamin B5 sebagai senyawa antimalaria.

1.3.2. Tujuan khusus

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peroral pada mencit Balb/c yang terinfeksi oleh *Plasmodium berghei* pada pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* intraeritrositer.
2. Mengetahui pengaruh pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peroral pada mencit Balb/c yang terinfeksi *Plasmodium berghei* pada kadar GSH sel eritrosit .

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan sumbangan terhadap perkembangan terapi antimalaria dengan provitamin B5 sebagai alternatif pengobatan baru pada penyakit malaria.

Selain itu juga di bidang akademik dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang proses biokimiawi yang terjadi dalam tubuh inang dan parasit setelah pemberian provitamin B5.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Permasalahan malaria

Malaria merupakan penyakit infeksi yang masih menjadi masalah di seluruh dunia, yang merupakan penyakit endemik di dua puluh satu negara Amerika dan di empat negara di Eropa (WHO, 2005). Penduduk negara miskin yang berjumlah 40 % dari total populasi dunia juga sangat berisiko terhadap penularan penyakit ini (Malaria Statistic, 2003). Malaria menjadi penyebab kematian lebih dari satu juta penduduk dunia dari 300 – 500 juta kasus klinis setiap tahun dan menimbulkan masalah kesehatan yang berat terutama pada usia anak-anak. (WHO, 2005; Malaria Statistic, 2003; White, 1991). Anak-anak yang bertahan hidup akan menderita gangguan kemampuan belajar sampai kerusakan otak. Wanita hamil dan anak yang dikandungnya juga rentan terhadap serangan malaria, yang banyak menyebabkan mortalitas perinatal, bayi dengan berat badan lahir yang rendah dan anemia maternal (Basu, 2004).

Malaria tidak saja menimbulkan dampak bagi kesehatan masyarakat, akan tetapi juga menimbulkan masalah dalam bidang ekonomi. Masalah yang ditimbulkan antara lain menurunkan produktivitas kerja, pariwisata, investasi asing dan transportasi. Ahli ekonomi memperkirakan beban perekonomian sebagai akibat malaria adalah 0,6 – 1 % dari GDP di Afrika, angka ini cenderung untuk meningkat (Basu, 2004).

Di Indonesia, malaria termasuk dalam 10 penyakit utama penyebab kematian yang mengancam 70 juta atau 35 % penduduk Indonesia yang tinggal di daerah yang berisiko terserang malaria. Program penanggulangan malaria untuk mengurangi risiko ini sejak tahun 1960 berhasil melakukan eradikasi malaria terutama di Jawa dan Bali, sehingga dinyatakan bebas malaria tahun 1970. Penyakit ini muncul kembali (*reemerging disease*) di kedua daerah tersebut, dengan angka kejadian malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* di Jawa dan Bali pada tahun 2003 tercatat 12957 dan 48 orang diantaranya meninggal. Angka kejadian malaria karena infeksi *Plasmodium falciparum* di luar Jawa dan Bali tahun 2003 tercatat 44.808 dan 211 orang meninggal (WHO, 2005; Depkes, 2003). Angka kejadian ini cenderung meningkat dengan adanya peningkatan mobilitas penduduk dan perubahan lingkungan (Depkes, 2003). Untuk menanggulangi berkembangnya penyakit tersebut, maka sejak tahun 2003 pemerintah mencanangkan program “Gerakan Berantas Kembali Malaria” (Gebrak Malaria) (Depkes, 2003).

Pengendalian penyakit malaria di negara berkembang masih menjadi masalah disebabkan karena pelayanan kesehatan yang kurang memadai dan kondisi sosial ekonomi yang rendah. Masalah ini menjadi semakin kompleks dengan meluasnya resistensi obat antimalaria, belum ditemukan vaksin antimalaria dan meningkatnya resistensi nyamuk terhadap insektisida (WHO, 2005; Tanneur, 2005). Pengembangan vaksin malaria masih terhambat karena kemampuan mutasi parasit malaria yang tinggi dan belum ditemukan vaksin yang memberi perlindungan seumur hidup, serta biaya produksi dan distribusi yang tinggi (Nunilon, 1992; Basu, 2004). Karena berbagai masalah tersebut, maka

usaha untuk menemukan senyawa baru yang dapat menghambat perkembangan parasit malaria sangat diperlukan (Saliba, 2004).

2.1.2 Morfologi dan siklus hidup plasmodium

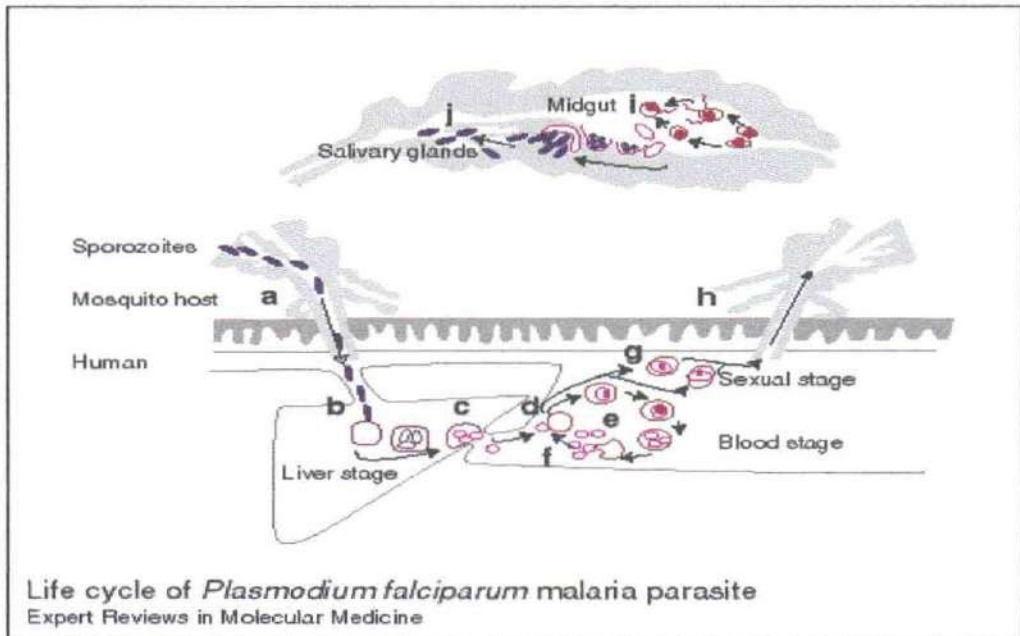
Malaria adalah penyakit parasit yang disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium* (WHO, 2002). Penyebab malaria pada manusia yaitu: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* dan *Plasmodium ovale*. *Plasmodium falciparum* menyebabkan gejala klinis yang paling berat dan menyebabkan angka kematian yang paling tinggi (USNAMRU2, 2003).

Plasmodium ditransmisikan oleh nyamuk *anopheline* betina yang menelan bentuk seksual parasit saat menghisap darah. Sporozoit yang infeksi berkembang dalam tubuh nyamuk dan dipindahkan kepada manusia sewaktu nyamuk menggigit manusia. Di dalam tubuh manusia parasit pertama kali berkembang menjadi bentuk eksoeritrositik, sporozoit mencapai sel hati dalam waktu 1 jam setelah diinjeksikan (Knirsh, 2003), lalu berkembang biak dalam sel hati tanpa menimbulkan reaksi inflamasi membentuk skizon. Setiap skizon berisi 2000 sampai 40.000 merozoit yang tidak berinti. Skizon akan pecah dan melepaskan merozoit. Fase eksoeritrositik ini akan berlangsung selama 5 hari – 21 hari tergantung jenis parasitnya. Pada *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* fase ini dapat berlangsung 1 – 2 tahun yang potensial menyebabkan kekambuhan (Tanneur, 2005). Merozoit yang terbentuk pada fase eksoeritrositik ini akan menginvasi eritrosit (Tanneur, 2005; James & Stephen, 2001).

Fase eritrositik adalah awal multiplikasi aseksual di dalam eritrosit. Merozoit yang matang akan membentuk tropozoit (bentuk cincin). Tropozoit

kemudian akan berkembang menjadi skizon dan akhirnya pecah. Siklus ini akan berulang terus, dengan diinvasinya eritrosit baru oleh merozoit yang dilepaskan oleh eritrosit yang pecah. Pada fase eritrosit ini di dalam darah dapat ditemukan beberapa bentuk parasit, yaitu :

- Bentuk trophozoit awal, berbentuk seperti cincin
- Bentuk trophozoit akhir, bentuk cincin dengan nukleus tunggal
- Bentuk skizon awal, nukleus mulai mengalami pembelahan
- Bentuk skizon akhir satu nukleus mulai diliputi oleh sitoplasma membentuk merozoit baru.
- Bentuk merozoit, satu eritrosit yang pecah akan melepaskan 8-24 merozoit baru (Ohio State University, 2005).



Gambar 2.1 : Siklus hidup *Plasmodium falciparum* (Carucci *et al.*,1998)

Beberapa trophozoit yang matang akan berkembang menjadi gametosit, dan jika gametosit ini terhisap oleh nyamuk maka siklus akan dilanjutkan ke siklus sporogonik di dalam tubuh nyamuk. Eritrosit yang terinfeksi akan mengalami destruksi dalam periode tertentu sesuai plasmodiumnya. *Plasmodium vivax* dan

Plasmodium ovale destruksi eritrosit terjadi setiap 48 jam, *Plasmodium malariae* setiap 72 jam, *Plasmodium falciparum* secara klasik terjadi setiap 48 jam akan tetapi sering tidak sinkron dengan siklus tersebut. (James & Stephen, 2001). Fase eritrositik ini berlangsung selama 1,5-2 minggu. (Knirsh, 2003).

2.1.3 *Plasmodium berghei*

2.1.3.1. Karakteristik *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei adalah salah satu dari anggota plasmodium yang menginfeksi tikus yang berasal dari Afrika Tengah. Pertama kali ditemukan oleh Vincke dan Lip tahun 1948.

Klasifikasi *Plasmodium berghei* :

Phylum	: Protozoa
Sub Phylum	: Sporozoa
Class	: Telosporea
Sub Class	: Coccidea
Family	: Plasmodiidae
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Species	: <i>Plasmodium berghei</i>

Dalam penelitian model malaria, yang digunakan adalah isolat *Plasmodium berghei*. Gambaran isolat *Plasmodium berghei* yang sering digunakan seperti yang tampak pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Gambaran Isolat, Inang dan vektor *Plasmodium berghei*.

Species		Inang		Vektor
<i>P. berghei</i>		<i>Grammomys surdaster</i>		<i>Anopheles durenii</i>
		<i>Praomys jacksoni</i>		
		<i>Leggada bella</i>		
Isolat	k173	Diisolasi dari	<i>Grammomys surdaster</i> (1948)	
	SP11		<i>A. durenii</i> (1961)	
	ANKA		<i>A. durenii</i> (1966)	
	LUKA		<i>A. durenii</i> (1966)	
	NK65		<i>A. durenii</i> (1964)	

Keterangan : Inang adalah species tikus dan mencit.
(LUMC, 2002).

Ada beberapa perbedaan karakteristik antara *Plasmodium berghei* dengan plasmodium yang menginfeksi manusia seperti yang tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 2.2. Perbedaan karakteristik *Plasmodium berghei* dengan *Plasmodium spp* yang menginfeksi manusia.

	<i>Plasmodium berghei</i>	Parasit manusia
Merosoit per skison	12-18	8-16
Ditemukan pada retikulosit	Ya	Ya/Tidak
Sinkronisasi infeksi darah	Tidak	Ya/Tidak
Kisaran suhu optimum untuk transmisi nyamuk	19-21 °C	>26 °C
Ukuran ookista	<45 µ	50-60 µ
Sporosoit di kelenjar pada temperatur optimum	13-14 °C	Tergantung suhu
Diameter skison yang matang	27 µ	45-60 µ
Waktu perkembangan pre-eritrositik (jam).	48-52	6-15 hari
Waktu perkembangan aseksual pada siklus eritrositik (jam).	22-24	48-72
Waktu perkembangan gametosit (jam)	26-30	48jam-12 hari

(LUMC, 2002).



2.1.3.2. Siklus hidup *Plasmodium berghei*

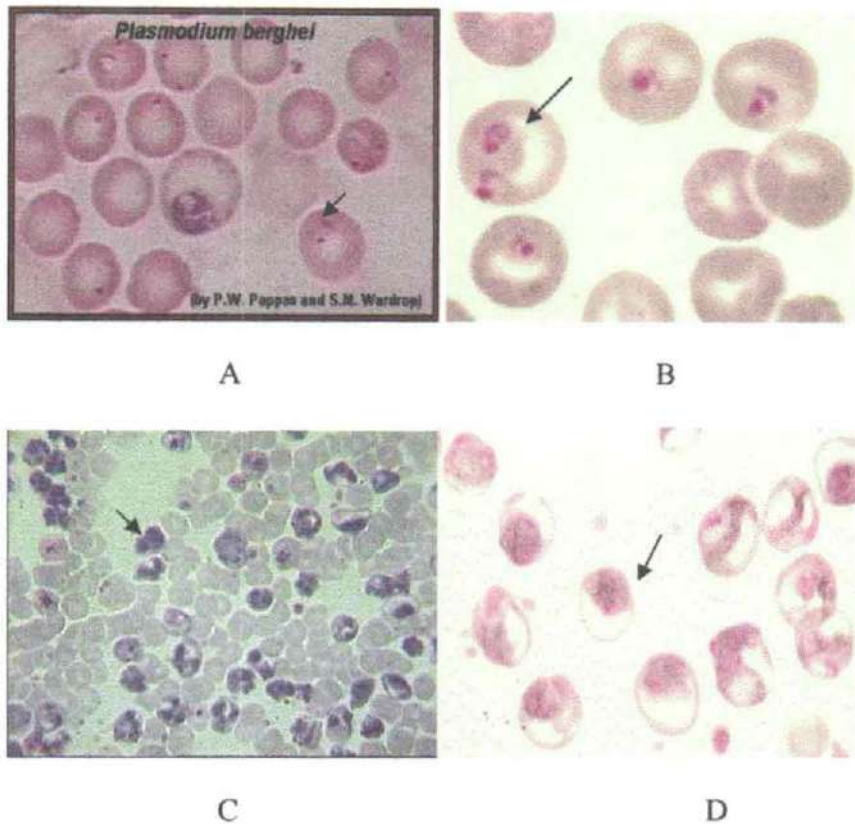
Siklus hidup *Plasmodium berghei* di dalam tubuh mencit meliputi :

1. Fase pre-eritrositik

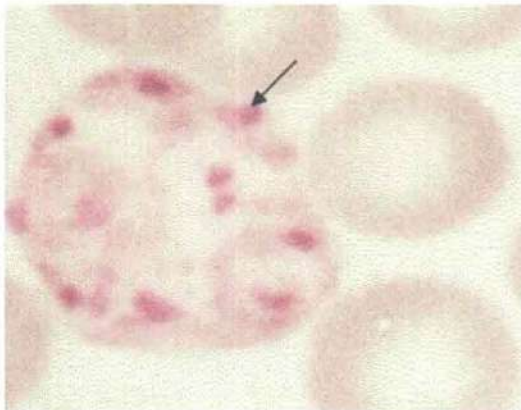
Sporozoit akan mencapai hepatosit dalam beberapa menit sampai beberapa jam. Di dalam hepatosit sporozoit akan berkembang menjadi bentuk trophozoit, kemudian menjadi skizon matang yang mengandung 1500-8000 merozoit. Skizon yang matang ini akhirnya pecah bersama dengan pecahnya hepatosit dan melepaskan merozoit. Tahapan ini membutuhkan waktu 47-52 jam. Dalam siklus hidup *Plasmodium berghei* tidak didapatkan hipnozoit atau fase dorman di dalam hepatosit.

2. Fase eritrositik


Merozoit yang dilepaskan dari hepatosit akan menginvasi eritrosit. *Plasmodium berghei* lebih sering menginvasi retikulosit dibandingkan eritrosit dewasa. Merozoit akan segera berkembang menjadi bentuk trophozoit setelah menginvasi eritrosit. Pada akhir trophozoit terjadi duplikasi DNA, yang diikuti oleh replikasi. Replikasi dilanjutkan dengan pembelahan nukleus, dan parasit berkembang menjadi bentuk skizon yang mengandung 8-24 nukleus. Skizon akan menghilang dari peredaran darah dan akan terkumpul di kapiler organ dalam. Siklus hidup *Plasmodium berghei* pada mencit laboratorium tidak sesuai dengan siklus hidup alaminya, yaitu trophozoit dan skizon didapatkan dalam peredaran darah (LUMC, 2002). Berikut adalah gambaran mikroskopis yang didapatkan dalam berbagai bentuk yang dilalui oleh *Plasmodium berghei* dalam siklus hidupnya.



Gambar 2.2 : Gambaran mikroskopis *Plasmodium berghei* dengan perbesaran 100x objektif; pewarnaan Giemsa. A. Bentuk cincin *Plasmodium berghei*, B. Trofozoit akhir *Plasmodium berghei*, C. Skizon *Plasmodium berghei*, D. Gametosit (Cieleka D&Salamatin R, 2005; LUMC, 2002).



Gambar 2.3 : Infeksi lebih dari satu parasit pada eritrosit dengan pewarnaan Giemsa, perbesaran 100x objektif (LUMC, 2005).

hpi	characteristics	morphology		
0-4	invasion (merozoites)			
4-8	intracellular growth			
8-12	intracellular growth			
12-18	intracellular growth			
18-20	schizogony sexuality manifest			
20-22	sexual dimorphism not visible			
22-23	schizogony completed			
23-26	sexual dimorphism visible			
26-27	gametocyto- genesis completed			
30-48	stable gametocytemia			
48-57	degeneration of gametocytes			

Gambar 2.4: Perkembangan parasit pada siklus eritrositik (LUMC, 2002).

2.1.4 Gejala klinis malaria

Patogenesis terjadinya gejala klinis pada malaria adalah:

a. Perubahan pada eritrosit

Setelah invasi ke dalam eritrosit, parasit akan segera tumbuh dan berkembang biak. Parasit yang sedang tumbuh ini akan terus-menerus memecah protein sel eritrosit inang terutama hemoglobin, dan menyebabkan perubahan pada membran sel eritrosit yaitu dengan mengubah sistem transport membran dan memasukkan derivat protein parasit ke dalam membran. Sel eritrosit menjadi

lebih sferis, dan akan terbentuk tonjolan (*knob*) dan selanjutnya perubahan ini akan menyebabkan terekspresinya faktor perlekatan yang menjadi perantara perlekatan eritrosit pada reseptor endotel kapiler dan vena. Pada fase ini tidak akan ditemukan parasit *Plasmodium falciparum* dalam pemeriksaan hapusan darah karena eritrosit terkumpul di vena postkapiler. Jika jumlah parasit bertambah banyak di dalam darah, maka parasit dapat ditemukan dalam pemeriksaan hapusan darah. Berkumpulnya parasit di dalam organ vital seperti otak dan hati akan mengganggu aliran mikrosirkulasi (White, 1991). Ketidakstabilan dalam aliran darah menyebabkan terjadinya kekurangan oksigenasi otak yang menjadi penyebab malaria serebral, yang sering menjadi penyebab utama kematian (Knirsh, 2003; Tanneur, 2005).

b. Reaksi inang terhadap infeksi

Respons inang terhadap infeksi ditandai dengan meningkatnya fungsi imunologik dan filtrasi dari limpa, sehingga terjadi peningkatan pemecahan eritrosit yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi. Selain karena peningkatan pemecahan sel eritrosit oleh limpa, sel eritrosit yang terinfeksi juga ikut pecah saat pecahnya skizon. Bahan-bahan yang dikeluarkan karena pecahnya eritrosit tersebut akan menginduksi aktivasi makrofag dan pelepasan sitokin (termasuk *tumor necrosis factor* dan *interleukin-1*) yang menyebabkan terjadinya panas badan (White, 1991).

Gejala klinis yang didapatkan pada malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* :

a. Demam, paroksismal dan menggigil disertai dengan berkeringat, anoreksia, sakit kepala, muntah dan malaise (WHO, 1999) Pada individu yang belum mempunyai imunitas terhadap malaria suhu badan bisa mencapai 40°C. Pada penderita malaria juga didapatkan anemia (White, 1991).

b. Malaria yang berat karena infeksi *Plasmodium falciparum*:

Gejala klinis malaria yang berat ini ditandai dengan perubahan tingkah laku yang abnormal, kadang-kadang disertai dengan kejang, delirium dan koma. Gejala-gejala seperti ini terjadi pada malaria serebral (Tanneur, 2005).

Komplikasi yang sering terjadi pada malaria karena *Plasmodium falciparum* adalah:

- a. Hipoglikemia yang sering didapatkan pada anak-anak dan pada wanita hamil,
- b. Asidosis laktat, biasanya menyertai hipoglikemia,
- c. *Noncardiogenic pulmonary edema*,
- d. Gagal ginjal,
- e. Abnormalitas darah; dengan disertai gejala-gejala, perdarahan, hematemesis. Pada hemolisis yang berat akan ditemukan ikterus dan pembesaran limpa (Knirsh, 2003).
- f. Komplikasi yang lain; pneumonia aspirasi pada saat kejang. (White, 1991).

2.1.5 Diagnosis malaria

Diagnosis malaria harus meliputi identifikasi parasit malaria atau antigennya atau produknya di dalam darah penderita. Dalam diagnosis malaria harus meliputi: identifikasi bentuk yang berbeda dari keempat spesies malaria, perbedaan tingkat skizogoni eritrositik, endemisitas dari spesies, hubungan antara imunitas, parasitemia dan gejala; serta adanya parasitemia yang tidak terdeteksi pada pemeriksaan mikroskopis. (Kakkilaya, 2005).

Diagnosis malaria ditegakkan melalui tes darah yang dibagi menjadi dua jenis pemeriksaan:

- a. Pemeriksaan mikroskopis
- b. Pemeriksaan non mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis baik dengan tetes tebal maupun hapusan darah sudah digunakan sebagai metode pemeriksaan malaria sejak seratus tahun yang lalu.

Pemeriksaan mikroskopis ada dua jenis :

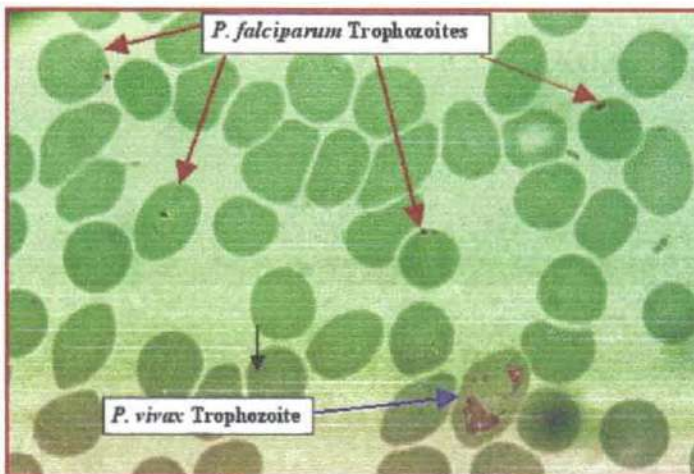
1. Pemeriksaan darah tepi
2. *Quantitative Buffy Coat Test*

Pemeriksaan darah tepi meliputi pembuatan hapusan darah, pengecatan dan pemeriksaan mikroskopis dari eritrosit untuk menemukan parasit intraseluler. Pengecatan yang sering digunakan untuk identifikasi parasit malaria adalah *Giemsa*, *Leishman* (WHO, 2000; Kakkilaya, 2005). Pemeriksaan darah tepi dengan pewarnaan *Giemsa* merupakan “*gold standart*” dalam diagnosis malaria. Sediaan darah tepi selalu dibuat dalam bentuk tetes tebal dan hapusan darah. Tetes

tebal digunakan untuk identifikasi adanya parasit, sedang hapusan darah untuk menentukan spesies penyebab malaria (WHO, 2000).



Gambar 2.5 : Tetes tebal *Plasmodium falciparum* dengan pewarnaan Giemsa, pembesaran 100x objektif dan 10 x okuler (Mae Hong Son&Mae Sod, 2002).



Gambar 2.6: Hapusan darah pemeriksaan malaria dengan pewarnaan Giemsa, dan pembesaran 100x objektif dan 10 x okuler (Mae Hong Son&Mae Sod, 2002).

Ada beberapa perbedaan karakteristik dari keempat plasmodium yang menginfeksi manusia, sebagaimana yang tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 2.3 : Tabel karakteristik plasmodium yang menginfeksi manusia

Karakteristik	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
Skizogoni di liver - preeritrosit - ukuran skizon liver -jumlah merozoit/hepatosit - hipnozoit - rekrudesensi - rekurensi	5,5-7 hari 60 μ 40.000 - + -	6-8 hari 45 μ 10.000 + + +(liver)	12-16 hari 45 μ 2000 - + +(darah)	9 hari 70 μ 15.000 + + +(liver)
Skizogoni eritrosit	<48 jam	48 jam	72 jam	50 jam
Eritrosit: -eritrosit yang terinfeksi -pembesaran eritrosit -bintik/pigmen eritrosit	Normosit muda - Maurer	Retikulosit, normosit >12 μ Schuffner	Normosit - Ziemann	Retikulosit, normosit muda <10 μ James
Parasit -Pigmen -Jumlah merozoit	Hitam 8-24 (36)	Coklat kekuningan 12-18 (24)	Coklat tua 8-12	Coklat tua 8-12
Inkubasi : -inkubasi intrinsik -inkubasi ekstrinsik	9-14 hari 10 hari	12-17 hari 8-9 hari	18 hari 26-28 hari	9 hari 12-14 hari
Prognosis -Kematian -Pasien yang tidak diterapi	+ Terjadi hiperparasitemia, malaria serebral, anemia berat, ikterus, sindroma nefrotik, hipertermia, shock hypotency	- -	- -	- -

(USNAMRU2, 2003).

Perbedaan gambaran mikroskopik sel eritrosit yang terinfeksi oleh keempat jenis plasmodium :

Tabel 2.4 : Gambaran mikroskopis sel eritrosit yang terinfeksi.

Parasit dalam darah	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
Bentuk parasit yang ditemukan	Tropozoit muda dan atau gametosit yang matang	Semua bentuk parasit, dan adanya bintik schuffner pada eritrosit	Semua bentuk parasit, dan adanya bintik schuffner pada eritrosit	Semua bentuk parasit, dan adanya bintik schuffner pada eritrosit
Tropozoit-ukuran	Kecil-medium	Kecil-besar	Lebih kecil dari <i>P. vivax</i>	Kecil
-jumlah	banyak	Sedikit-sedang	Sedikit	Sedikit
-bentuk	Cincin atau koma	Tidak teratur	Cincin atau bulat	Cincin atau bulat
-kromatin	Dua titik	Satu	Satu	Satu, besar
-sitoplasma	teratur	Fragmen	Regular	Regular, padat
-pigmen	bintik kasar	Bergerombol, halus	Bergerombol, kasar	Bergerombol, banyak kasar
Skizon : -Ukuran	-Kecil dan kompak	Besar	Seperti <i>P. malariae</i>	Kecil, kompak
-Jumlah	sedikit, atau tidak ada	Sedikit-sedang	Sedikit	Sedikit
-Bentuk matur	12-30 merozoit	12-24 merozoit	4-12 merozoit	6-12 merozoit
-pigmen	Gelap	Masa longgar	massa terkonsentrasi	terkonsentrasi
Gametosit -Bentuk imatur	<i>Point-end form</i>	Sama dengan tropozoit matur	Sama dengan tropozoit matur	Sama dengan tropozoit matur
-Bentuk matur	<i>Banana shape</i>	Bundar, besar	Bundar	Bundar, kompak
-kromatin	Satu	Satu	Satu	Satu
-pigmen	Tersebar	Tersebar dan halus	tersebar	Tersebar

(USNAMRU2, 2003).

Pemeriksaan mikroskopis darah tepi mempunyai beberapa keuntungan dan kerugian.

Keuntungan :

1. Sensitif
2. Informatif
3. Murah
4. Teknik diagnostik yang general

Kerugian :

Mebutuhkan keterampilan dan pengalaman laboratorium (WHO, 2000).

Quantitative Buffy Coat Test (QBC Test).

QBC test merupakan salah satu metode pemeriksaan parasit malaria dalam darah tepi, dengan menggunakan pewarnaan *acridine orange*. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop fluoresens atau dibawah sinar ultraviolet. Pemeriksaan dengan metode ini cepat, mudah dilakukan dan lebih sensitif dibandingkan tetes tebal, tetapi tidak bisa digunakan untuk membedakan keempat spesies penyebab malaria (Fernandez, 2006).

Pemeriksaan non mikroskopis :

1. *Rapid Diagnostic Test (RDT)*

Pemeriksaan ini berdasarkan pada deteksi antigen dari parasit malaria dengan menggunakan metode imunokromatografi. Pemeriksaan cepat, dapat dilakukan dalam 15 menit (WHO, 2000). Beberapa macam pemeriksaan yang termasuk RDT adalah :

a. *Histidine-rich Protein 2 of Plasmodium falciparum (PfHRP2) Test*

Pemeriksaan ini berdasarkan adanya protein yang larut dalam air yang dihasilkan oleh *Plasmodium falciparum* fase aseksual dan gametosit, diekspresikan pada permukaan sel eritrosit dan masih dapat terdeteksi di dalam darah setelah 28 hari terapi antimalaria.

b. *Aldolase Plasmodium Test (PMA)*

Aldolase adalah enzim jalur glikolitik dari parasit pada saat fase eritrositik parasit baik itu *Plasmodium falciparum* maupun non *Plasmodium falciparum*.

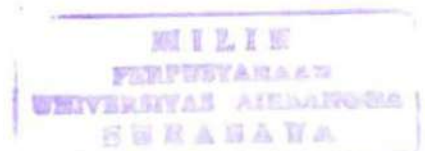
c. *Parasite lactate dehydrogenase (pLDH)*

LDH adalah enzim glikolitik yang larut dalam air yang dihasilkan oleh parasit pada fase seksual dan aseksual. Enzim ini ditemukan pada semua spesies malaria yang menginfeksi manusia (WHO, 2000).

Perbandingan antara ketiga pemeriksaan tersebut adalah :

Tabel 2.5. Perbandingan ketiga jenis RDT

Perbandingan RDT untuk Antigen Malaria			
	PfHRP2 tests	PMA test	pLDH test
Antigen target	Histidine rich protein 2 dari <i>Plasmodium falciparum</i> , protein yang larut air yang terekspresi pada membran eritrosit	<i>Plasmodium</i> aldolase. Enzim glikolitik parasit yang dihasilkan oleh semua parasit dan PfHRP2	Lactate dehydrogenase parasit, merupakan enzim glikolitik parasit yang dihasilkan oleh semua spesies parasit
Hasil tes	2 garis	3 garis	3 garis
Kemampuan	Hanya mendeteksi <i>Plasmodium falciparum</i>	Mendeteksi semua spesies	Mendeteksi semua spesies
Infeksi campuran <i>Plasmodium falciparum</i> dan non <i>Plasmodium falciparum</i>	Tampak seperti <i>Plasmodium falciparum</i>	Tampak seperti <i>Plasmodium falciparum</i> .	Tampak seperti <i>Plasmodium falciparum</i>



Batas deteksi	>40-100 parasit/ μ L	Lebih tinggi pada <i>Plasmodium vivax</i> dan species non-falciparum	> 100-200 parasit/ μ L untuk <i>Plasmodium falciparum</i> dan <i>Plasmodium vivax</i> ; lebih tinggi pada <i>Plasmodium malariae</i> and <i>Plasmodium ovale</i>
Keberadaan antigen setelah terapi	Ditemukan sampai 31 hari	Ditemukan lebih lama	Ditemukan 1-3 minggu
Reaksi silang antar spesies malaria	Pernah dilaporkan	Pernah dilaporkan	Pernah dilaporkan
Reaksi silang dengan autoantibodi	83% dengan factor rheumatoid	Tidak diketahui	3,3 % dengan factor rheumatoid
Deteksi adanya parasit hidup	Tidak dapat	Tidak dapat	Tes yang positif menunjukkan adanya parasit hidup

(Kakkilaya, 2005).

2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi keempat spesies malaria, khususnya pada kasus dengan tingkat parasitemia yang rendah dan adanya infeksi campuran (*mixed infection*). PCR juga dapat menganalisis sampel dalam jumlah yang banyak dalam waktu yang singkat. Di samping keuntungan yang terdapat pada pemeriksaan dengan PCR, teknik pemeriksaan ini masih tergolong mahal untuk dilakukan di negara berkembang. (Urdaneta *et al.*, 1998; ASM, 2005).

3. Deteksi Antibodi terhadap malaria

Antibodi terhadap malaria dapat dideteksi dengan menggunakan imunofluoresens atau *enzyme immuno assay*. Pemeriksaan ini sangat berguna untuk survei epidemik, untuk tes penyaring donor darah, dan mendeteksi

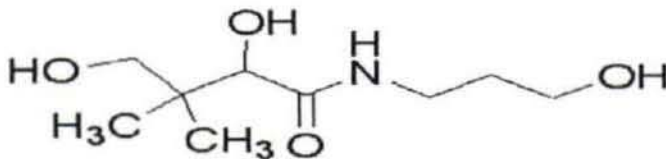
infeksi yang sedang dialami oleh individu yang tidak mempunyai imunitas terhadap malaria.

4. Flowsitometri

Flowsitometri dan *automated hematology analyzer*, bermanfaat dalam mendiagnosis malaria bersamaan dengan hitung darah rutin. Jika dalam pemeriksaan ditemukan pigmen malaria di dalam lekosit, juga bisa untuk menentukan tingkat keparahan malaria (Kakkilaya, 2005).

2.2 Provitamin B5

Provitamin B5 adalah derivat vitamin B5, dikenal juga dengan nama Dexpanthenol, Pantenol, Pantotenol, ®-2,4-dihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutyramide (Vitamin Expert Committee, 2001). Rumus kimianya $C_9H_{19}NO_4$ dengan berat molekul 205,3 dalton. Provitamin B5 adalah bentuk sintetik yang tidak ditemukan dalam bentuk alami di dalam bahan makanan tertentu (Pdrhealth, 2005).

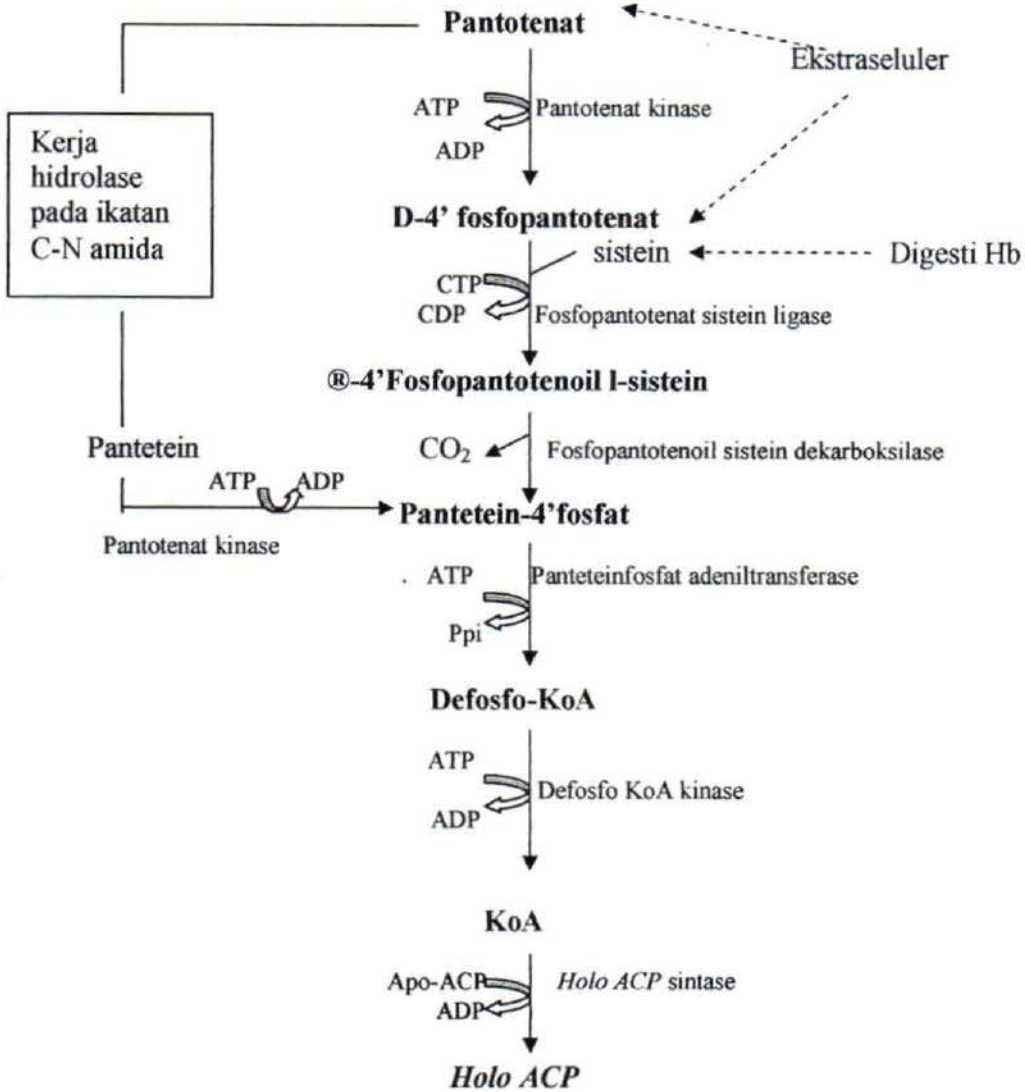


Gambar 2.7 : Struktur kimia Provitamin B5 (Sigma, 2005).

Provitamin B5 digunakan secara topikal untuk penyembuhan luka, digunakan secara luas dalam industri kosmetik, dan digunakan untuk pengobatan lupus eritematosus secara oral (Pdrhealth, 2005; Expert Committee on Vitamin and Minerals, 2001).

Provitamin B5 yang diberikan per oral akan diserap di dalam usus halus. Absorpsi provitamin B5 melalui mekanisme transport aktif yang tergantung pada natrium dan difusi pasif. Distribusi provitamin B5 ke berbagai jaringan melalui darah dalam bentuk yang terikat dengan eritrosit. Provitamin B5 akan dikonversikan menjadi vitamin B5 (asam pantotenat) di dalam tubuh yang merupakan prekursor Ko-enzim A (KoA). KoA termasuk di dalam komponen dalam pelepasan energi dari karbohidrat (siklus Krebs) dan juga penting untuk sintesis asetilkolin, fosfolipid, porfirin dalam sintesis hemoglobin sel eritrosit (Pdrhealth, 2005; Expert Committee on Vitamins and Minerals, 2001). Metabolisme vitamin B5 untuk membentuk KoA seperti yang tampak dalam gambar pada halaman berikut ini.

Biosintesis KoA.



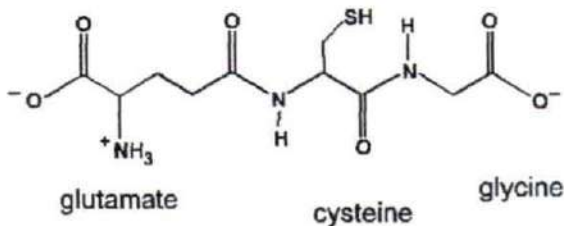
Gambar 2.8. Gambar ini merupakan adaptasi dari *CoA Biosynthesis* dalam *Plasmodium Biochemistry Pathway* (Ginsburg, 2004).

Asam pantotenat dan derivatnya: asam 4-fosfopantotenat, pantotenol, dan pantetine, secara *in vitro* juga melindungi sel terhadap peroksidasi lipid dengan mekanisme peningkatan Ko-enzim A sel. Ko-enzim A mengeliminasi peroksi lipid dengan meningkatkan mobilisasi asam lemak dan memacu perbaikan membran plasma dengan mengaktivasi sintesis fosfolipid. Asam pantotenat dan derivatnya juga meningkatkan kadar *reduced glutathione* (GSH) dengan mekanisme yang belum diketahui (Pdrhealth, 2005; Slyshencov, 2004).

2.3 Glutathione (GSH)

GSH merupakan tripeptida esensial yang terdiri dari asam glutamat, sistein dan glisin (γ -glutamil-sistein-glisin) yang memiliki struktur seperti yang terdapat pada gambar 2.9. GSH mengandung gugus sulfhidril (-SH) yang merupakan bagian yang berperan penting dalam molekul GSH (Mayes A.Peter, 2003).

glutathione (GSH)



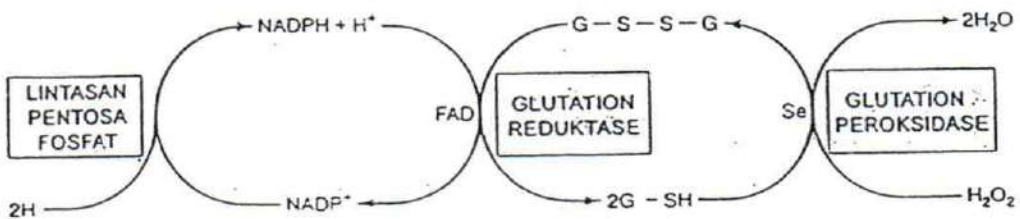
Gambar 2.9 : Struktur GSH dan GSSG (Baynes dan Dominickzak, 2002).

GSH mampu melindungi sel terhadap serangan oksidan dan komponen xenobiotik elektrofilik yang potensial beracun (karsinogen tertentu). Sistem redoks GSH mempunyai peranan penting dalam mempertahankan homeostasis GSH intraseluler. Di dalam sistem ini dibutuhkan GSH sebagai ko-substrat dalam proses detoksifikasi senyawa peroksida seperti hidrogen peroksida ataupun lipid

peroksida menjadi senyawa yang tidak berbahaya dengan melibatkan enzim glutathion peroksidase. GSH tersebut selama reaksi diubah menjadi bentuk teroksidasi GSSG dan oleh enzim glutathion reduktase akan diubah menjadi bentuk GSH kembali melalui siklus redoks. Siklus ini membutuhkan NADPH yang berasal dari *Hexose Monophosphat Shunt* (HMP Shunt). Sejumlah xenobiotik elektrofilik akan terkonjugasi ke GSH nukleofilik dalam reaksi yang digambarkan sebagai berikut :



R adalah xenobiotik elektrofilik. Enzim yang mengkatalis reaksi ini adalah glutathion S-transferase.



Gambar 2.10: Siklus redoks GSH (Murray *et al.*, 2003).

GSH memiliki beberapa fungsi penting lainnya dalam sel tubuh manusia di luar peranannya dalam metabolisme xenobiotik, yaitu (Murray, *et al.*, 2003) :

1. Turut serta dalam proses dekomposisi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang potensial bercun di dalam reaksi yang dikatalis oleh glutathione peroksidase.



2. Apabila radikal hidroksil ($\cdot OH$) masih terbentuk, maka GSH dapat meredamnya melalui reaksi sebagai berikut



3. Peredam lain seperti alkil, DNA radikal dan DNA radikal peroksil



4. Merupakan zat pereduksi intrasel yang penting oleh karena membantu mempertahankan gugus -SH yang esensial pada sejumlah enzim dalam keadaan tereduksi :

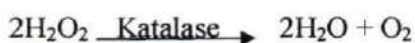


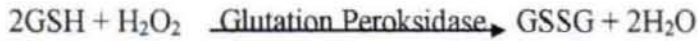
5. Mengubah kembali menjadi bentuk vitamin C dari bentuk radikalnya :



Sel eritrosit secara terus menerus terpapar oleh ROS, karena kandungan O_2 yang tinggi dan besi heme memudahkan pembentukan ROS. Superoksid (O_2^-) dapat terbentuk secara spontan pada reaksi pengikatan O_2 oleh hemoglobin, pada reaksi yang dikatalis oleh enzim oksidase juga menghasilkan O_2^- dan H_2O_2 . Oksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin akan melepaskan heme yang akan bereaksi dengan O_2^- dan H_2O_2 membentuk radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$). Untuk meredam ROS tersebut sel eritrosit mempunyai beberapa perlindungan antioksidan, diantaranya katalase, superoxide dismutase (SOD), dan glutathione (GSH). SOD meredam $\cdot\text{O}_2^-$ menjadi H_2O_2 , selanjutnya H_2O_2 diubah menjadi H_2O dan O_2 oleh katalase. Radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) yang terbentuk akan diredam oleh glutathione peroksidase .

Kerja antioksidan di atas dapat diringkas dalam skema berikut :





GSH sel eritrosit dipertahankan tetap pada kadar 2 mmol/L untuk mempertahankan fungsi tersebut. Untuk memenuhi kebutuhan GSH tersebut selain melalui siklus redoks GSH, juga mendapatkan transport dari organ penghasil terbesar GSH yaitu hepar (Droge, 2002; Baynes&Dominickzak, 2003; Wu *et al.*, 2004; Murray, *et al.*, 2003).

2.4. Peranan Provitamin B5 Dalam Menghambat Pertumbuhan Parasit Malaria

Merozoit dari fase eksoeritrositer akan memasuki eritrosit, dan akan berubah menjadi bentuk trophozoit (*ring form*) 15 jam setelah invasi. Pada fase eritrositik ini eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* akan mengalami beberapa perubahan. Bentuk eritrosit yang semula bikonkaf menjadi bentuk yang lebih sferis dan terdapat tonjolan yang disebut “*knob*” pada permukaannya. Perubahan morfologi ini juga diikuti dengan meningkatnya aktifitas metabolisme dari parasit (Kirk *et al.*, 1991). Parasit berkembang menjadi bentuk skizon yang merupakan masa amplifikasi dengan menghasilkan 8-32 merozoit baru. Setelah skizon matang eritrosit akan pecah dan melepaskan merozoit baru yang siap menginvasi eritrosit yang lainnya. Satu siklus ini berlangsung kira-kira 48 jam. Peningkatan aktivitas metabolisme dan biosintesis dari parasit di dalam eritrosit diikuti dengan meningkatnya permeabilitas membran. Pada fase ini membran mempunyai permeabilitas yang lebih tinggi terhadap zat-zat yang dibutuhkan oleh parasit, salah satunya adalah pantotenat (Divo *et al.*, 1985).

Asam pantotenat yang berasal dari cairan ekstraselular tersebut di dalam tubuh parasit akan menjadi bahan untuk mensintesis KoA dengan melalui langkah yang pertama yaitu fosforilasi asam pantotenat yang dikatalisis oleh enzim pantotenat kinase (Expert Committee on Vitamin and Minerals, 2001).

Bentuk aktif asam pantotenat adalah Koenzim A (KoA) dan *Acyl Carrier Protein* (ACP). KoA merupakan 4-fosfopantetein yang dihubungkan oleh ikatan anhidrida dengan nukleotida adenosin 5'-monofosfat. Gugusan sulfidril membentuk ikatan tioester dengan gugusan asil membentuk derivat asil KoA, termasuk asetil KoA. Asetil KoA memiliki beberapa manfaat metabolik, diantaranya dapat dimetabolisme menjadi energi dalam siklus Krebs. Asetil KoA dapat dimetabolisme juga menjadi asam lemak, kolesterol dan hormon steroid. Asetil KoA juga berperan dalam reaksi asetilasi untuk membentuk asetil kolin, melatonin dan terakhir asetil-KoA juga berperan dalam asetilasi protein dan histon. ACP berfungsi sebagai koenzim dalam kompleks asam lemak sintase yang merupakan pusat sintesis asam lemak. Bentuk KoA yang lainnya juga mempunyai peran biologis yang penting diantaranya: malonil KOA berperan dalam sintesis asam lemak dan suksinil KoA berperan dalam sintesis hem (Pdrhealth, 2005).

Analog asam pantotenat sudah lama diketahui sebagai senyawa untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Genschel, 2004). Brackett *et al.* pertama kali memberikan analog asam pantotenat diberikan pada ayam yang telah diinfeksi dengan *Plasmodium gallinaceum* yang mendapat perlakuan diberikan diet defisiensi asam pantotenat atau analog asam pantotenat per oral, ternyata didapatkan adanya penekanan pertumbuhan parasit yang bermakna pada

fase eritrositik. Parasit mendapatkan pantotenat dari sel inang, dengan menginduksi peningkatan permeabilitas sel eritrosit inang, kemudian asam pantotenat akan diangkut ke dalam cairan intraselular parasit dan mengalami fosforilasi untuk memenuhi kebutuhan KoA parasit (Saliba, 1998).

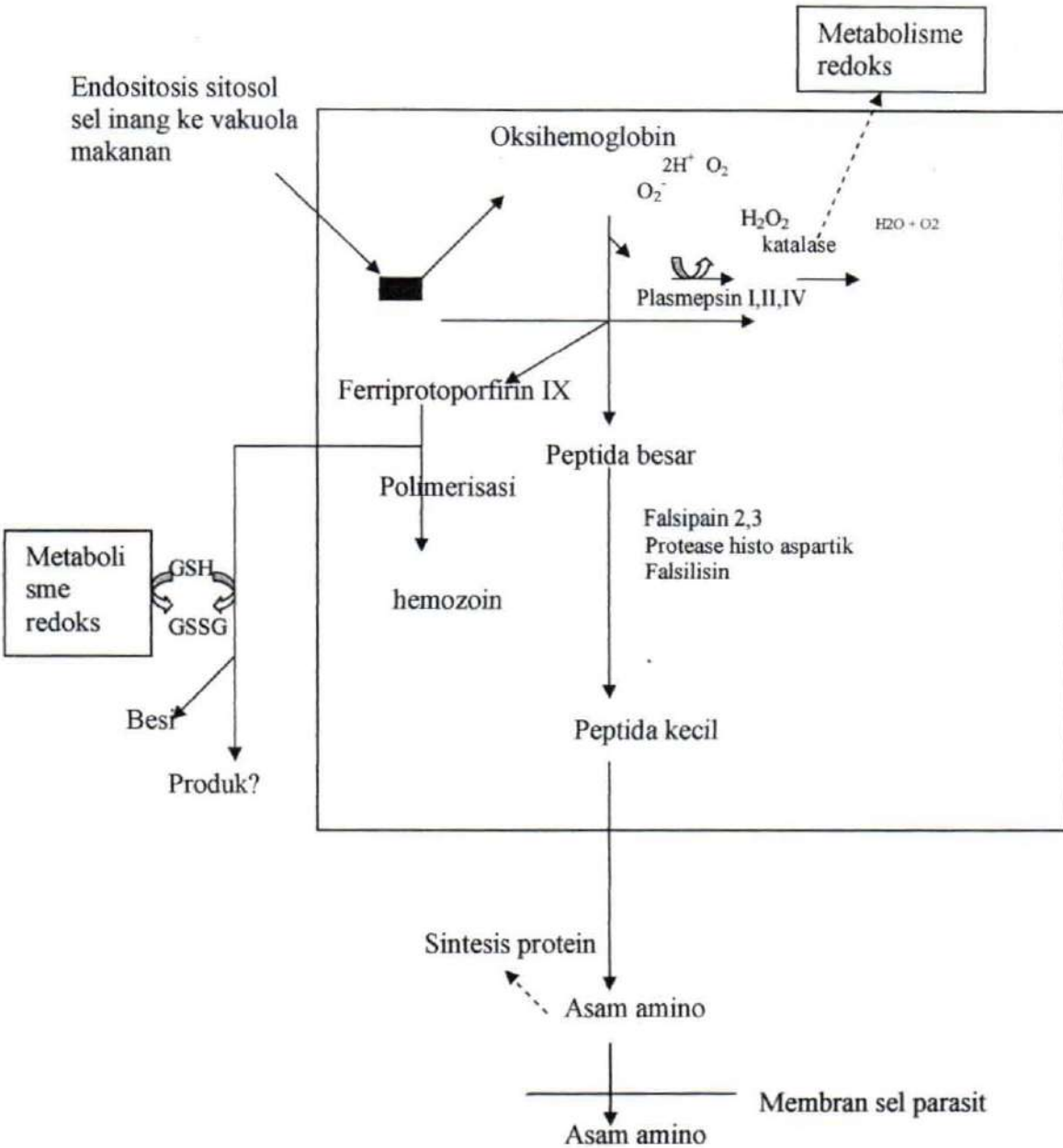
Provitamin B5 menghambat pertumbuhan parasit plasmodium dengan cara menghambat reaksi fosforilasi untuk pembentukan KoA. Provitamin B5 menjadi inhibitor kompetitif terhadap enzim pantotenat kinase yang mengkatalisis reaksi fosforilasi asam pantotenat (Saliba *et al.*, 2004). Pada penelitian yang dilakukan oleh Saliba *et al.* dosis efektif yang diperlukan untuk menurunkan pertumbuhan parasit hingga 85 % yaitu 1,4 g/kgBB per oral tanpa adanya efek samping (Saliba, *et al.*, 2004). Dosis untuk melindungi binatang dari efek kerusakan sel oleh karena iradiasi gamma adalah 26 mg/hari dengan pemberian intragastrik (Slyshenkov *et al.*, 1998). Pada penelitian yang lain dari Slyshencov didapatkan bahwa sel yang diinkubasikan dengan 1 mM pantotenol akan meningkatkan aktivitas GSH (Slyshencov, 2004). Beberapa kasus efek toksik akut atau kronik terjadi pada dosis yang sangat tinggi dan terjadi dalam waktu yang lama (beberapa tahun), yaitu 10 gram/kgBB/hari. Gejala toksisitas tersebut adalah diare dan gangguan gastrointestinal (Expert Committee on Vitamin and Minerals, 2001).

Mekanisme peningkatan kadar GSH oleh asam pantotenat dan derivatnya belum diketahui. Peningkatan kadar GSH mempunyai peranan dalam melindungi membran sel terhadap kerusakan peroksidatif. Provitamin B5 sebagai derivat dari vitamin B5 dapat melindungi sel terhadap efek yang merusak dari radiasi gamma yang menimbulkan banyak senyawa oksigen reaktif. Efek protektif dari

provitamin B5 tersebut disebabkan karena kemampuannya memacu sintesis Koenzim-A dan peningkatan GSH (Slyshencov, 1998).

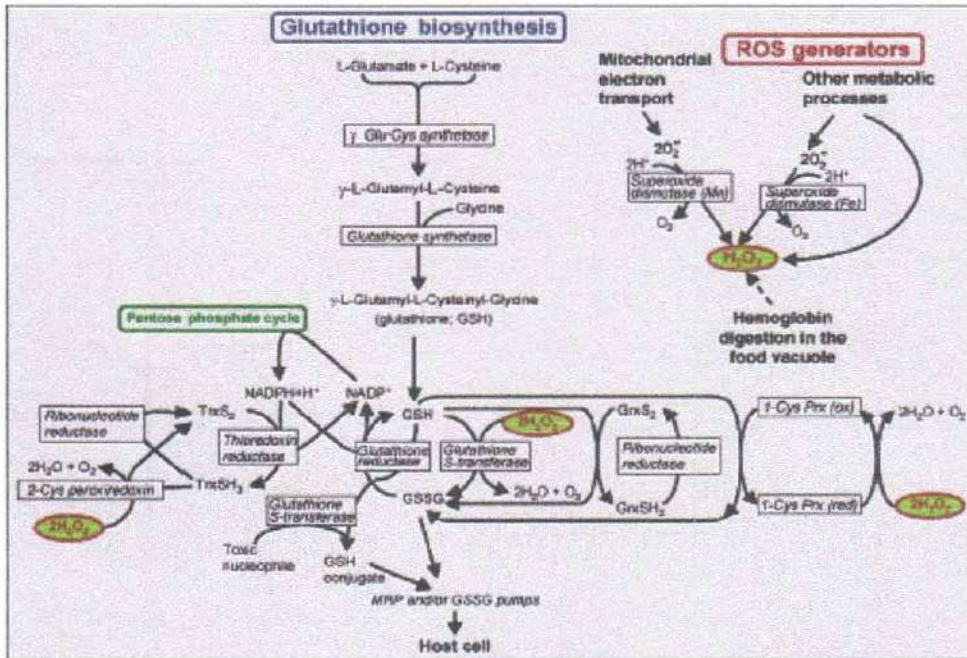
Peningkatan metabolisme dan aktivitas biosintesis pada fase eritrositer ini menyebabkan meningkatnya senyawa oksigen reaktif (SOR) (Ginsburg&Atamna, 1994). SOR menginduksi terjadinya stress oksidatif pada eritrosit yang terinfeksi dan pada parasit, SOR terutama berasal dari proses degradasi hemoglobin inang oleh parasit. Degradasi hemoglobin ini menghasilkan hem bebas (feriprotoporfirin IX) dan H₂O. Fe teroksidasi (Fe³⁺) yang terdapat pada feriprotoporfirin IX dalam keadaan kadar oksigen yang tinggi dan suasana pH yang asam di dalam vakuola makanan parasit akan memacu terbentuknya radikal oksigen melalui reaksi Fenton dan Haber-Weiss (Sullivan DJ, 2005).

Hem bebas ini bersifat toksik terhadap membran eritrosit yang akan meningkatkan fragilitas eritrosit (Tiley, 2001), dan juga pada membran sel parasit yang menginfeksi eritrosit (Muller, 2003; Hughes, 1995; Ginsburg, 2004). Hem bebas akan dinetralisir oleh GSH menjadi hemozoin atau pigmen malaria (Ginsburg, 2004).



Gambar 2.11. Digesti hemoglobin dan polimerisasi feriprotoporfirin IX, diadaptasi dari *Hemoglobin digestion and feriprotoporfirin IX polymerization* dalam *Plasmodium Biochemistry Pathway* (Ginsburg, 2004).

Parasit di dalam eritrosit mampu melindungi dirinya dari stress oksidatif karena kemampuan mensintesis GSH (DFN Platel, 1999; Ginsburg, 2004). Mekanisme pertahanan tersebut tampak pada skema berikut.



Gambar 2.12: Skema umum berbagai proses biokimia antioksidan parasit malaria (Ginsburg, 2004).

Parasit mengalami stress oksidatif yang berasal dari produk metabolisme selnya sendiri, terutama dari proses digesti hemoglobin sel inang. Meningkatnya stress oksidatif tersebut dimulai dari fase trophozoit akhir. SOR yang tidak dapat diredam didalam sel parasit akan dikeluarkan ke sel inang. Sistem antioksidan sel inang menjadi tidak efektif lagi untuk menetralsir oksidan karena meningkatnya stress oksidatif di dalam sel inang dan meningkatnya peroksi lipid pada membran akibat stress oksidatif tersebut (Ginsburg, 2004).

Sistem antioksidan yang bekerja di dalam sel parasit diantaranya :

Superoxide Dismutase (SOD)

Parasit intraeritrosit akan mencerna sitosol sel inang yang mengandung hemoglobin . Oksidasi hemoglobin di dalam vakuola makanan akan menghasilkan superoxide (O_2^-) yang secara spontan diubah menjadi H_2O_2 di dalam tubuh parasit karena kerja dari SOD (Ginsburg, 2004).

Glutathione (GSH)

Plasmodium falciparum mempunyai kemampuan untuk mensintesis GSH. Jika GSH yang dihasilkan tidak mencukupi maka parasit bisa mentransport GSH dari sel inangnya, di samping juga karena adanya kemampuan sel mamalia untuk mentransport GSH, GSSG dan GSH yang terkonjugasi. Peningkatan kadar GSH parasit merupakan faktor yang kurang menguntungkan karena meningkatkan terjadinya resistensi terhadap obat antimalaria seperti kloroquin (Ginsburg, 2004; Dubois, 1997).

Provitamn B5 juga meningkatkan sintesis GSH (Slyshenkov, 2004) , GSH akan mengaktifkan glutathione peroksidase, selanjutnya enzim ini akan melindungi sel inang dari kerusakan oksidatif, sehingga akan mengurangi gejala klinis yang terjadi pada infeksi malaria (Ginsburg&Atamna, 1997; U.J.Dumaswala, *et al.*, 2001; Slyshenkov, 1998).

2.5 Pengujian Provitamin B5 sebagai Antimalaria

Pengujian provitamin B5 sebagai antimalaria dengan menggunakan mencit sebagai model mengikuti beberapa metode, di antaranya :

1. *Plasmodium berghei* 4 day suppression test (Peter's test)

Mencit diinfeksi dengan 0,2 ml suspensi *Plasmodium berghei* secara intraperitoneal atau intavena dan dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kemudian pada hari pertama sampai hari ketiga setelah infeksi dilakukan pemberian senyawa antimalaria pada kelompok perlakuan dan zat pembawa pada kelompok kontrol. Pada hari keempat (24 jam tanpa pemberian obat) dilakukan pemeriksaan parasitemia.

2. Hill's Test for causal prophylaxis and residual activity

Mencit yang sudah diinokulasi *Plasmodium* akan menjalani beberapa perlakuan:

a. Fase 1, pengujian aktivitas profilaksis

Tiga jam setelah inokulasi dilakukan pemberian senyawa antimalaria sampai hari keempat belas. Suatu senyawa memiliki aktivitas profilaksis jika didapatkan parasitemia kurang dari 2 % pada hari ke-14.

b. Fase 2, pengujian aktivitas residual

Senyawa antimalaria diberikan 48 jam sebelum inokulasi pada kelompok perlakuan. Jika waktu yang dibutuhkan untuk mencapai parasitemia 2 % pada kelompok perlakuan sama dengan kelompok kontrol, maka senyawa tersebut tidak mempunyai aktivitas residu.

c. Fase 3, pengujian aktivitas residual yang memanjang

Mencit yang sudah diinokulasi Plasmodium diberikan senyawa antimalaria. 48 jam setelah pemberian senyawa antimalaria diambil darah intrakardiak dan diinjeksikan ke mencit yang sehat. Pada hari ke-14 setelah injeksi dilakukan pemeriksaan parasitemia. Senyawa yang tidak memiliki aktivitas residual jika mencit yang memiliki tingkat parasitemia 2 % mencapai 75 % dari keseluruhan mencit yang diinfeksi.

d. Fase 4, pengujian tambahan

Senyawa antimalaria diberikan 48 jam sebelum injeksi Plasmodium ke dalam tubuh mencit. Tiga jam setelah infeksi, darah mencit diambil dan diinjeksikan ke dalam tubuh mencit yang sehat. Pada hari ke-14 dilakukan pemeriksaan parasitemia untuk mengetahui adanya aktivitas residual sebagaimana uji fase 2 (Kalra BS, 2006).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual

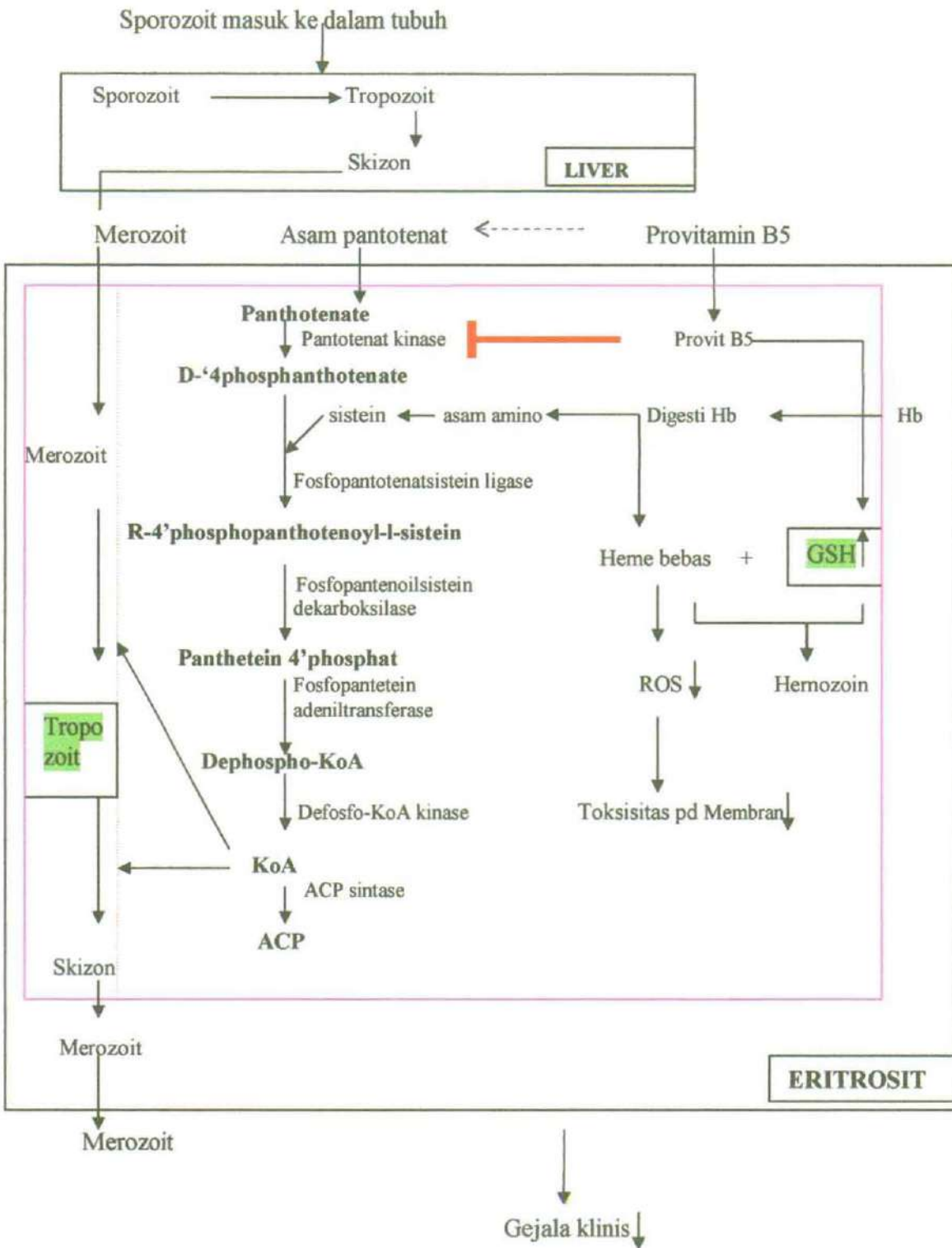
Penyebab malaria yang memberikan gejala paling berat adalah *Plasmodium falciparum*. Merozoit dari fase eksoeritrositer akan memasuki eritrosit dan menjadi bentuk trophozoit (ring form) 15 jam setelah invasi. Pada fase ini eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* akan mengalami beberapa perubahan. Bentuk eritrosit yang semula bikonkaf menjadi bentuk yang lebih sferis dan terdapat tonjolan yang disebut “knob” pada permukaannya (Sherman *et al.*, 2004). Perubahan morfologi ini juga diikuti dengan meningkatnya aktifitas metabolik dari parasit (Kirk *et al.*, 1991). Parasit kemudian memasuki fase skizon yang merupakan fase amplifikasi yang menghasilkan 8-32 merozoit baru. Pada fase ini eritrosit akan pecah dan melepaskan merozoit baru yang siap menginvasi eritrosit yang lainnya. Fase ini berlangsung kira-kira 48 jam. Peningkatan aktivitas metabolisme dari parasit di dalam eritrosit diikuti oleh meningkatnya permeabilitas membran eritrosit. Membran mempunyai permeabilitas yang lebih tinggi terhadap zat-zat yang dibutuhkan oleh parasit salah satunya adalah pantotenat (Divo *et al.*, 1985). Peningkatan metabolisme pada fase eritrositer ini menyebabkan meningkatnya Senyawa Oksigen Reaktif (SOR) (Ginsburg&Atamna, 1994).

SOR menginduksi terjadinya stress oksidatif pada eritrosit yang terinfeksi, SOR terutama berasal dari proses degradasi hemoglobin inang oleh parasit. Degradasi hemoglobin ini menghasilkan hem bebas (ferriprotoporfirin IX) dan H₂O₂. Hem bebas ini bersifat toksik terhadap membran eritrosit yang akan

meningkatkan fragilitas eritrosit (Tiley, 2001), dan juga pada membran sel parasit yang menginfeksi eritrosit (Muller, 2003; Hughes, 1995; Ginsburg, 2004). Hem bebas akan dipolimerisasi oleh GSH menjadi hemozoin atau pigmen malaria (Ginsburg, 2004).

Salah satu obat antimalaria yang menghambat pertumbuhan parasit malaria intraeritrositer yaitu provitamin B5. Pantotenol atau provitamin B5 merupakan inhibitor kompetitif bagi enzim pantotenat kinase, sehingga fosforilasi asam pantotenat untuk pembentukan KoA tidak terjadi. (Saliba, 2004).

Provitamin B5 juga meningkatkan sintesis GSH (Slyshencov, 2004), GSH akan membentuk polimer heme bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme hemoglobin, sehingga tidak toksik lagi terhadap membran sel. Hem bebas mempunyai sifat toksik terhadap membran eritrosit sehingga meningkatkan fragilitas eritrosit (Tiley, 2001).



Bagan 3.1: Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan bagan :

- > : Panah dengan garis putus-putus menggambarkan konversi provitamin B5 menjadi vitamin B5
- > : Panah garis lurus menggambarkan arah perkembangan parasit dalam siklus hidupnya dan metabolisme asam pantotenat (vitamin B5) di dalam tubuh.
- | : Hambatan fosforilasi asam pantotenat oleh provitamin B5 sebagai inhibitor kompetitif pada enzim pantotenat kinase. Akibat hambatan ini adalah terhentinya produksi KoA yang diperlukan untuk pertumbuhan parasit. Terhambatnya pertumbuhan parasit mengakibatkan penurunan destruksi eritrosit, selanjutnya akan mengurangi gejala klinis.
- ABC : Parameter yang akan diukur.

3.2. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peroral pada mencit Balb/c yang terinfeksi *Plasmodium berghei* menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* intraeritrositer.
2. Pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari peroral pada mencit Balb/c yang terinfeksi *Plasmodium berghei* meningkatkan kadar GSH sel eritrosit .

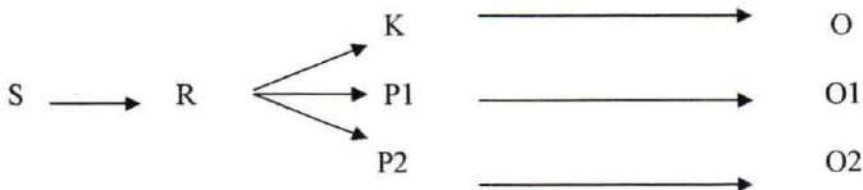
BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian.

Berdasarkan permasalahan yang diteliti, maka penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Penelitian yang dilakukan yaitu dengan menggunakan *Plasmodium berghei* sebagai model infeksi *Plasmodium falciparum*. Mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan diberikan provitamin B5 dalam beberapa dosis yang berbeda sebagai kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah mencit Balb/C yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* dan disonde aquades sebagai pelarut provitamin B5. Pada kelompok perlakuan mencit Balb/C diberikan provitamin B5 peronde dengan dosis 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari selama 3 hari (*The 4-days suppressive test of blood schizontocidal action*), pada hari keempat dibuat hapusan darah tepi dan tetes tebal dari ekor yang dilukai untuk melihat parasitemia dan diambil darah intrakardial untuk mengukur kadar GSH eritrosit. Dosis provitamin B5 yang diberikan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Saliba (2004) dan Slyshencov (1998).



Keterangan :

S : Sampel

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol, diberi aquades 0,4 ml personde

P1 : Kelompok perlakuan 1 mencit Balb/C diberi 1,4 g/kgBB/hari provitamin B5 personde

P2 : Kelompok perlakuan 2 mencit Balb/C diberi 5,6 g/kgBB/hari provitamin B5 personde

O : Parasitemia dan kadar GSH sel eritrosit kelompok kontrol

O1 : Parasitemia dan kadar GSH sel eritrosit kelompok P1

O2 : Parasitemia dan kadar GSH sel eritrosit kelompok P2

4.2. Unit Eksperimen, Randomisasi dan Replikasi**4.2.1. Unit Eksperimen**

Unit eksperimen yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/C jantan dewasa yang berumur 8-9 minggu dengan berat badan 15-30 gram dengan kondisi yang sehat diperoleh dari laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

4.2.2. Randomisasi

Pembagian kelompok pada unit eksperimen dilakukan dengan cara *simple random sampling* (Zainuddin, 2000).

4.2.3. Replikasi

Replikasi ditentukan dengan rumus Higgins & Kleinbaum (1985) sebagai berikut :

$$r \geq \frac{1}{1-f} \times \frac{2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot Sc^2}{(Xc - Xt)^2}$$

Keterangan :

- r = Jumlah replikasi per kelompok
- Xt = Nipura kelompok eksperimen (17,12)
- Xc = Nipura kelompok kontrol (25,70)
- Sc = Simpang baku kelompok kontrol (4,56)
- f = Proporsi kegagalan (0,20)
- $Z_{\alpha/2}$ = 1,96 ($\alpha = 0,05$)
- Z_{β} = 1,28 ($\beta = 0,10$)

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan, replikasi minimal 8 ekor mencit Balb/C, sehingga sampel sebanyak 24 ekor mencit Balb/C, dibagi menjadi tiga kelompok.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel

4.3.1.1. Variabel bebas

- Provitamin B5

4.3.2.2. Variabel tergantung

- a. Parasitemia
- b. GSH sel eritrosit

4.3.2.3. Variabel kendali

- Mencit Balb/C

4.3.2. Definisi Operasional

a. Provitamin B5

Pantotenol, Dexpantenol, (*R*)-2,4-dihydroxy-*N*-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutyramide atau $C_9H_{19}NO_4$ yang didapat dari Sigma katalog P 2375, dosis yang digunakan dalam penelitian, yaitu 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari (Saliba, 2004; Pdrhealth, 2005).

b. Parasitemia

Sel eritrosit yang terinfeksi yang ditemukan pada pemeriksaan hapusan darah yang ditentukan dengan rumus :

$$\% \text{ eritrosit terinfeksi} = \frac{\text{eritrosit yang mengandung parasit}}{\text{total eritrosit}} \times 100\%$$

Total eritrosit yang dihitung harus mencapai 5000 eritrosit.

c. GSH sel eritrosit

Tripeptida yang mengandung sistein dari sel eritrosit kadarnya dinyatakan dalam $\mu\text{mol/g}$ Hb, yang ditentukan dengan metode Anderson.

d. Mencit Balb/C

Mencit Balb/C yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/C jantan sehat yang sudah diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

4.4. Bahan Penelitian**4.4.1. Hewan uji**

Hewan uji menggunakan mencit Balb/C jantan yang berumur 8-9 minggu, berat badan 15-30 gram dengan kondisi yang sehat yang ditandai dengan bulu yang mengkilat, berat badan yang cukup, gerakan yang aktif dan tidak didapatkan luka, didapatkan dari laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

4.4.2. Bahan untuk perlakuan**1. Provitamin B5**

Dexpantenol, yang didapat dari Sigma dengan nomor katalog P 2375,

2. Suspensi parasit *Plasmodium berghei*.

Plasmodium berghei strain ANKA yang di dapat dari Lembaga Biomolekuler Eijkman dalam bentuk simpanan beku di *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga.

4.4.3. Bahan untuk pemeriksaan

1. Ether untuk pembiusan.

2. Pemeriksaan parasitemia :

Untuk pemeriksaan parasitemia diperlukan *Giemsa stock solution*, methanol absolut , air bersih, minyak imersi.

3. Preparasi sediaan eritrosit

Preparasi sediaan eritrosit memerlukan Etilendiamin Tetraasetat (EDTA) 10 %, NaCl 0,9 % dan PBS (*phosphate buffered saline*) 0,01M pH 7,4.

4. Pemeriksaan kadar GSH sel eritrosit

Pemeriksaan kadar GSH sel eritrosit memerlukan larutan *sulphosalicylic acid* (SSA) 4,1 %, larutan *phosphate buffered KCl* 1,17 M pH 7,4, 5,5-dithiobis (2- nitrobenzoic acid) (DTNB) 1 M.

5. Pemeriksaan hemoglobin

Pemeriksaan kadar hemoglobin memerlukan larutan *Drabkin's* dan larutan standar hemoglobin 15 g /dL.

4.5. Instrumen Penelitian

4.5.1. Instrumen untuk perlakuan

1. *Disposable spuit* 1 ml untuk penyuntikan *Plasmodium berghei* intraperitoneal kepada mencit Balb/C dan pengambilan darah intrakardial.
2. Spuit yang ujungnya dipasang suatu sonde no.24 yang dapat dimasukkan ke dalam mulut mencit Balb/C hingga mencapai oesophagus.
3. Kotak kaca untuk pembiusan.
4. Alat pembedahan.

4.5.2. Instrumen untuk pemeriksaan

1. Alat untuk menimbang berat badan mencit Balb/C (Timbangan Berkel tipe EH N.106.601)
2. Alat untuk pemeriksaan parasitemia adalah :
Gunting, gelas objek, pipet, mikroskop binokuler (mikroskop binokuler Olympus CH 20), rak pewarnaan.
3. Alat untuk pemeriksaan GSH
Spektrofotometer (*Spectronic 20 D*), tabung *ependorf*, *ultracentrifuge* (*Automatic Preparative Ultracentrifuge Hitachi 55P-7*), *vortex*, *micropipette*, kertas saring *whatman 42*.
4. Alat untuk pemeriksaan hemoglobin:
Spektrofotometer (*Spectronic 20 D*), *micropipette*, *cuvet*.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia Universitas Airlangga Surabaya.

4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 10 bulan, mulai bulan Oktober 2005 sampai Nopember 2006. Perincian waktu tersebut dapat dilihat pada lampiran 9.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari terhadap air, makanan serta suhu di dalam kondisi laboratorium

4.7.2. Penginfeksian *Plasmodium berghei*

1. Mencit Balb/C dibersihkan di daerah perut untuk persiapan injeksi *Plasmodium berghei*.
2. Mencit Balb/C disuntikkan 10^6 *Plasmodium berghei* dalam 200 μ L darah mencit Balb/C donor secara intraperitoneal (lampiran 2). Persiapan mencit donor: .
 - a. Sediaan beku parasit dicairkan dan dihangatkan pada suhu tubuh (37°C)
 - b. 200 μ L sediaan parasit diinjeksikan pada mencit donor dan dilakukan pemeriksaan parasitemia setiap hari,
 - c. Jika parasitemia mencapai 20 % mencit diterminasi dan dilakukan pengambilan darah intrakardiak.
 - d. Dilakukan pengenceran darah dengan alcheiver, perbandingan darah: alcheiver adalah 1:3.
 - e. Darah donor yang sudah diencerkan diinjeksikan kepada mencit Balb/C uji.

4.7.3. Perlakuan pemberian provitamin B5

1. Mencit Balb/C ditimbang berat badannya
2. Diberikan provitamin B5 yang dilarutkan dalam aquades dengan dosis 1.4 g/kgBB/hari untuk P1 dan 5,6 g/kgBB/hari untuk P2 personde setiap hari sampai hari ketiga.. Kelompok kontrol diberikan aquades 400 μ L personde (lampiran 3). Perhitungan dosis pemberian provitamin B5 dapat dilihat pada lampiran 4.

4.7.4. Pemeriksaan parasitemia

1. Mencit Balb/C dilukai ekornya dan diambil darah beberapa tetes untuk hapusan darah dan tetes tebal yang dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan (lampiran 5)
2. Pewarnaan hapusan darah dengan *Giemsa* (lihat pada lampiran 5)
3. Setelah sediaan kering diperiksa di bawah mikroskop dan dihitung jumlah parasit dalam setiap 5000 eritrosit dengan perbesaran 10X okuler dan 100X objektif menggunakan minyak imersi. Data parasitemia digunakan untuk mengetahui kemampuan provitamin B5 untuk menghambat pertumbuhan parasit dengan rumus :

$$\% \text{ penghambatan} = 100 \% - \left(\frac{\text{pertumbuhan parasit kelompok uji (D4-D0)}}{\text{rata-rata pertumbuhan parasit kelompok kontrol}} \times 100\% \right)$$

4.7.5. Pemeriksaan GSH sel eritrosit

Eritrosit yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari darah mencit Balb/C yang diambil dari jantung dan menggunakan antikoagulan Etilendiamin Tetraasetat (EDTA) 10 %. Penentuan kadar GSH sel eritrosit dengan cara mengukur kadar GSH menurut protokol yang dilakukan oleh Anderson (1997). Prinsip metode ini adalah jika 5,5 dithiobis-(2-nitobenzoic acid) (DTNB) bereaksi dengan GSH maka akan membentuk 2,5 DTNB yang berwarna kuning. Kemudian dilihat dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu. Prosedur pemeriksaan GSH sel eritrosit lihat lampiran 6.

Untuk menghitung kadar GSH sel eritrosit diperlukan pemeriksaan hemoglobin (Hb) sebagai faktor koreksi sebagaimana rumus berikut.

$$\begin{aligned} \text{Kadar GSH} &= \frac{\text{GSH sel eritrosit } (\mu\text{mol/L})}{\text{Hemoglobin (g/dL)}} \\ &= \frac{\text{GSH sel eritrosit } (\mu\text{mol/L})}{10 \text{ Hemoglobin (g/L)}} \end{aligned}$$

Kadar GSH dinyatakan dalam $\mu\text{mol/g Hb}$.

(Chavan SN, 2005).

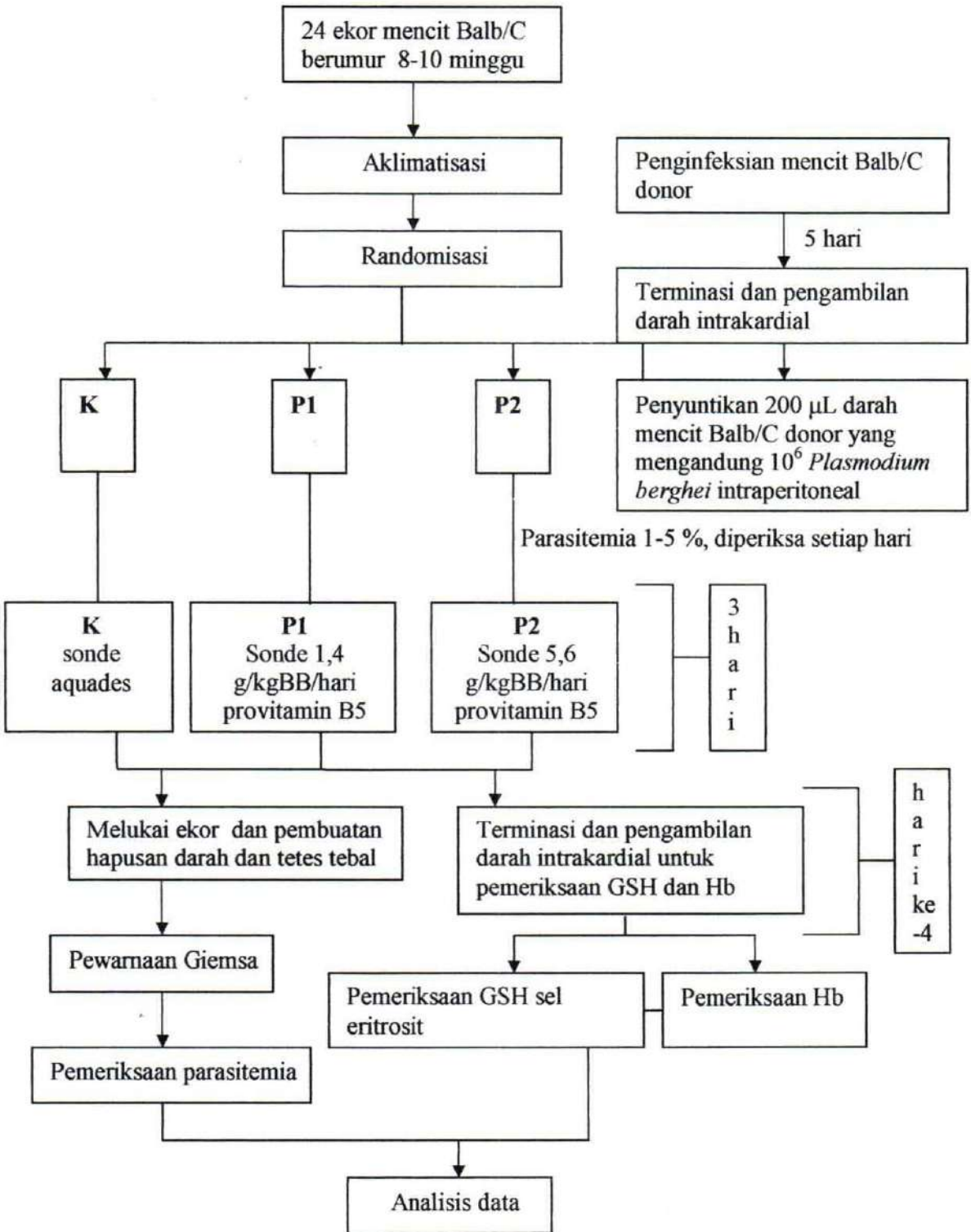
GSH dan hemoglobin di dalam sel eritrosit membentuk suatu kompleks GSH-hemoglobin. Jika terjadi penurunan kadar hemoglobin, maka akan mempengaruhi kadar GSH sel eritrosit (Srivastava & Beutler, 1970; Dumaswala UJ *et al.*, 2001; Wisner, 2006).

Pemeriksaan hemoglobin menggunakan darah mencit Balb/C yang diambil dari jantung dan menggunakan antikoagulan EDTA 10 %. Pemeriksaan hemoglobin dilakukan dengan menggunakan metode sianmethemoglobin. Prinsip pemeriksaan ini adalah eritrosit yang ditambahkan larutan *Drabkin's* akan mengalami hemolisis dan hemoglobinnya akan diubah menjadi sianmethemoglobin. Sampel darah kemudian diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu (lampiran 7).

4.8. Analisis Data

Deskripsi data dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk narasi, tabel dan jika diperlukan dalam bentuk diagram. Data dianalisis dengan menggunakan Analisis Varian (Anova) dengan derajat kemaknaan 5 %, dan bila terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok pada uji Anova, maka uji statistik dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference Test*), untuk mendapatkan hasil pasangan kelompok yang memiliki perbedaan.

4.9. Kerangka Operasional Penelitian



Bagan 4.1: Kerangka operasional penelitian.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Data Berat Badan Antar Kelompok Perlakuan

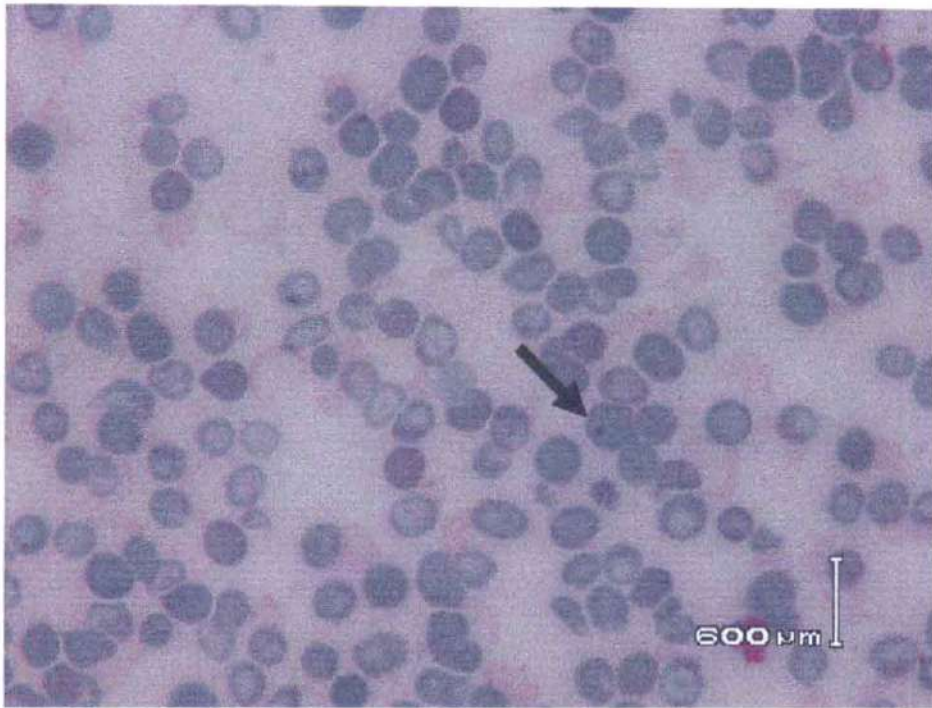
Tabel 5.1 Hasil pengukuran berat badan

Kelompok	Hari I		Hari II		Hari III		Hari IV	
	Rerata (gram)	SD	Rerata (gram)	SD	Rerata (gram)	SD	Rerata (gram)	SD
Kontrol	28,7	2,2	28,5	1,6	28,6	0,6	28,2	1,8
P1	26,6	3,1	27,5	3,1	27,1	1,1	27,0	2,9
P2	27,1	4,1	26,9	4,2	26,4	1,4	26,4	3,5

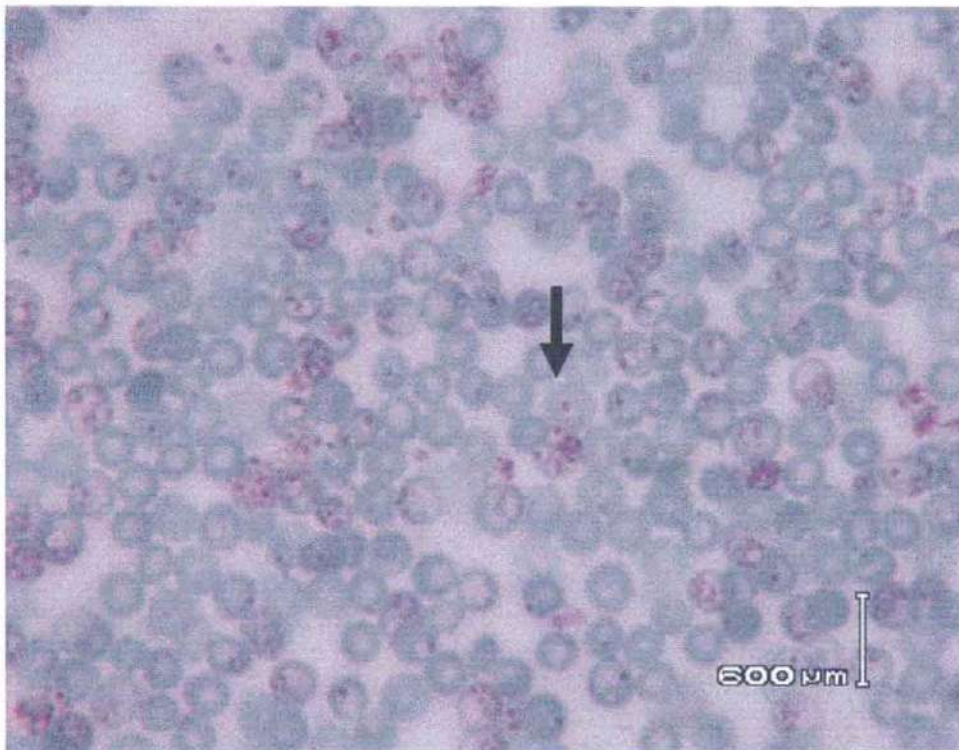
Berat badan antar kelompok percobaan pada hari I tidak didapatkan beda yang bermakna ($p= 0,409$) pada derajat kemaknaan 5 %. Data berat badan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 8. Berat badan antar kelompok perlakuan pada hari ke-2 tidak didapatkan beda yang bermakna ($p= 0,599$) pada derajat kemaknaan 5 %. Berat badan antar kelompok perlakuan pada hari ke-3 tidak didapatkan beda yang bermakna ($p= 0,348$) pada derajat kemaknaan 5 %. Berat badan antar kelompok perlakuan pada hari ke-4 tidak didapatkan beda yang bermakna ($p= 0,416$) pada derajat kemaknaan 5 %.

5.2. Data Parasitemia

Gambaran sel eritrosit yang terinfeksi pada setiap kelompok sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan adalah sebagai berikut:

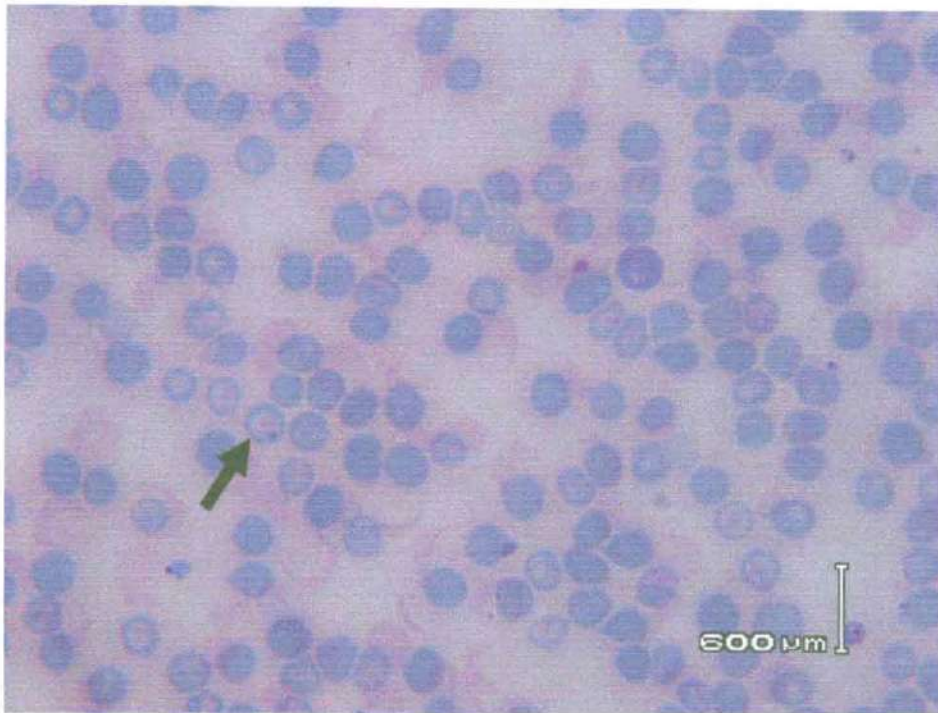


(a)

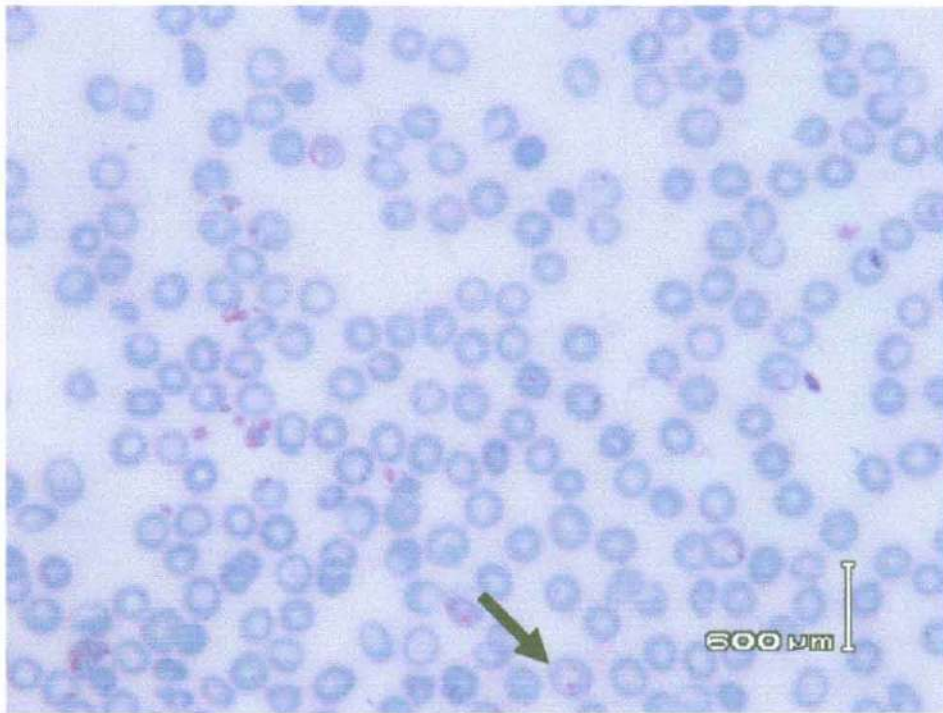


(b)

Gambar 5.1 Parasitemia kelompok kontrol dengan pewarnaan Giemsa dan dilihat dengan perbesaran 10x okuler dan 100x objektif. Sel eritrosit yang terinfeksi ditunjukkan dengan tanda panah; a. Hari I, b. Hari IV

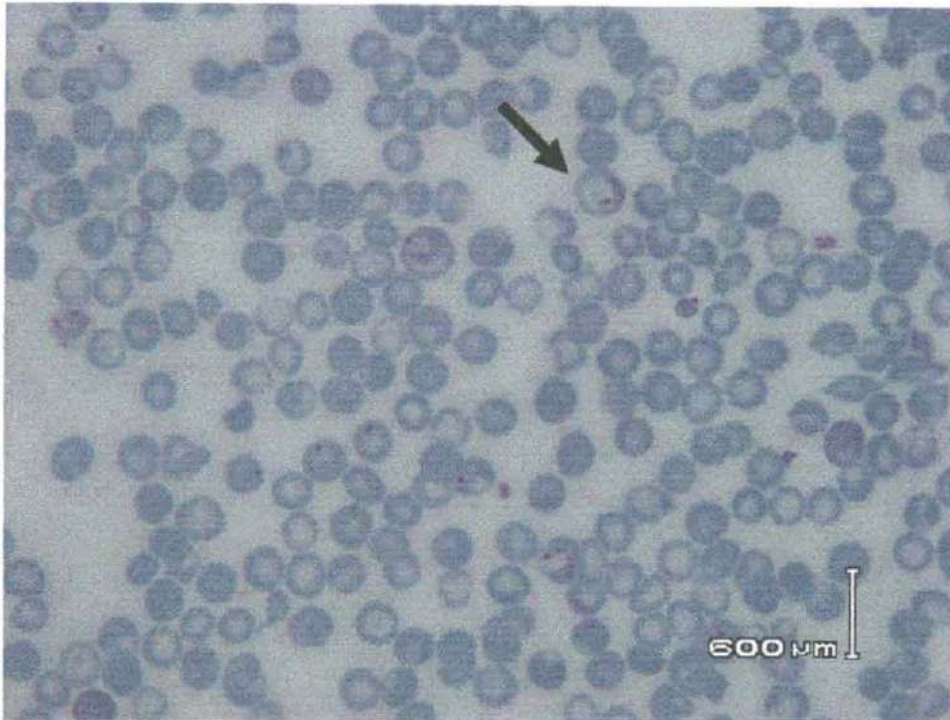


(a)

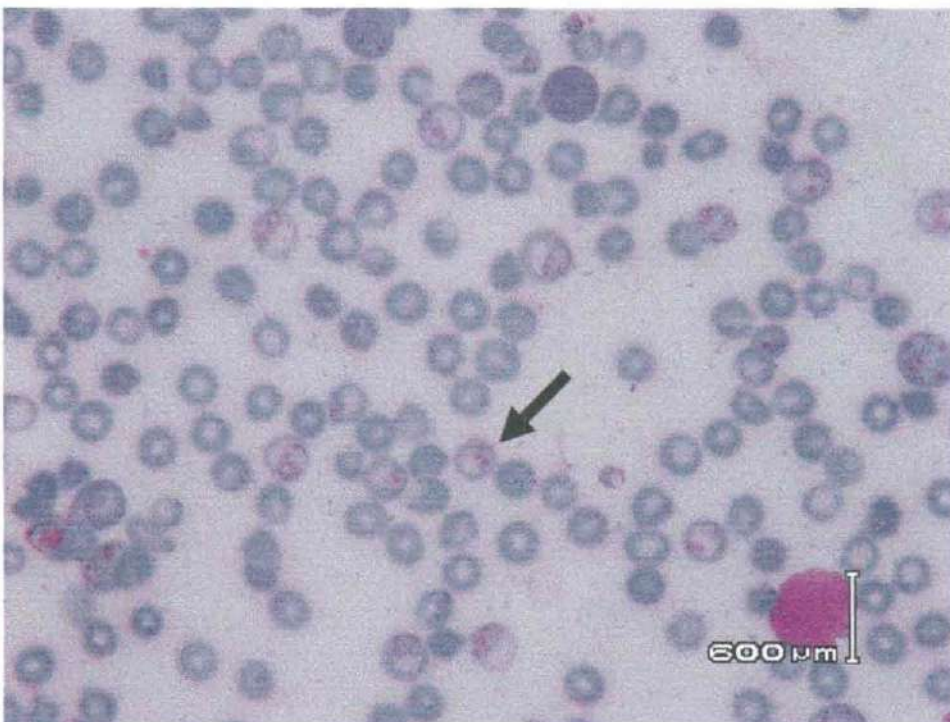


(b)

Gambar 5.2 Parasitemia kelompok P1 dengan pewarnaan Giemsa, dilihat dengan perbesaran 10x okuler dan 100x objektif. Sel eritrosit yang terinfeksi ditunjukkan dengan anak panah; a. Hari I, b. Hari IV



(a)



(b)

Gambar 5.4 Parasitemia kelompok P2 dengan pewarnaan Giemsa dan dilihat dengan perbesaran 10x okuler dan 100x objektif. Sel eritrosit yang terinfeksi ditunjukkan dengan anak panah; a. Hari I, b. Hari IV

Tingkat parasitemia pada setiap kelompok sebelum perlakuan (D0), setelah perlakuan (D4), persentase pertumbuhan parasit dan persentase hambatan pertumbuhan parasit terlihat pada tabel berikut.

Tabel 5.2 Parasitemia sebelum perlakuan (D0)

Kelompok	Rerata parasitemia (%)	SD	Anova Oneway
Kontrol	1,94 ^a	0,66	F=3,501 p=0,049
P1	2,45	1,14	
P2	3,24 ^a	1,10	

Keterangan : a P2 berbeda bermakna dibandingkan kontrol (p=0,016)

Berdasarkan ringkasan data di atas parasitemia sebelum perlakuan terdapat perbedaan antar kelompok (p=0,049), sehingga analisis dilanjutkan dengan uji LSD dan didapatkan hasil adanya perbedaan antara parasitemia kelompok P2 dengan kontrol (p=0,016)

Tabel 5.3. Parasitemia sesudah perlakuan (D4)

Kelompok	Rerata parasitemia (%)	SD	Anova Oneway
Kontrol	17,78 ^a	3,22	F=18,78 p=0,000
P1	8,46 ^a	2,21	
P2	18,52	4,99	

Keterangan : a P1 berbeda bermakna dibandingkan kontrol (p=0,000)

Dari tabel di atas terlihat bahwa peningkatan parasitemia yang paling rendah terjadi pada kelompok perlakuan 1 ($8,46 \pm 2,21$ %) dibandingkan dengan kontrol ($17,78 \pm 3,22$ %). Uji Anova Oneway menghasilkan adanya perbedaan antar kelompok (p=0,000), sehingga uji dilanjutkan dengan LSD dan didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok P1 dibandingkan kontrol (p=0,000).

Tabel 5.4. Persentase pertumbuhan parasit

Kelompok	Rerata parasitemia (%)	SD	Anova Oneway
Kontrol	15,85 ^a	3,54	F=15,86 p=0,000
P1	6,01 ^{a,b}	2,27	
P2	15,29 ^b	5,33	

Keterangan : a P1 berbeda bermakna dibandingkan kontrol (p=0,000)

b P1 berbeda bermakna dibandingkan P2 (p=0,000).

Persentase pertumbuhan parasit kelompok P1 ($6,01 \pm 2,27$ %) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol ($15,85 \pm 3,54$ %). Dari hasil uji Anova Oneway didapatkan beda bermakna antar kelompok, maka uji dilanjutkan dengan LSD dan didapatkan beda yang bermakna antara kelompok P1 dibandingkan kontrol (p=0,000) dan antara kelompok P1 dengan P2 (p=0,000).

Tabel 5.5. Hambatan pertumbuhan parasit

Kelompok	Hambatan (%)	SD	Anova Oneway
Kontrol	0,00 ^a	22,3	F=15,78 P=0,000
P1	61,9 ^a	14,3	
P2	3,6	33,6	

Keterangan: a terdapat perbedaan bermakna antara kelompok P1 dibandingkan kelompok kontrol .

Persentase hambatan pertumbuhan parasit yang lebih tinggi dibandingkan kontrol didapatkan pada kelompok P1 ($61,9 \pm 14,3$ %). Dari hasil analisis dengan Anova Oneway didapatkan beda bermakna antar kelompok, sehingga uji dilanjutkan LSD, didapatkan hasil adanya beda bermakna antara kelompok P1 dengan kelompok kontrol (p=0,000) dan P1 dengan kelompok P2 (p=0,000).

5.3. Data Kadar GSH Sel Eritrosit Mencit Balb/C.

Hasil pengukuran kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C dapat diringkas dalam tabel berikut.

Tabel 5.6. Hasil pengukuran kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C

Kelompok	Rerata kadar GSH sel eritrosit ($\mu\text{mol/gHb}$)	SD	t-test
Kontrol	0,42	0,34	p=(0,023)
P1	0,19 ^a	0,06	
P2	0,83 ^a	0,69	

Keterangan : a terdapat beda bermakna antara kelompok P1 dengan P2.

Dari tabel di atas terlihat bahwa kadar GSH sel eritrosit pada kelompok P1 ($0,19 \pm 0,06 \mu\text{mol/gHb}$) lebih rendah dibandingkan kontrol ($0,42 \pm 0,34 \mu\text{mol/gHb}$) dan pada kelompok P2 ($0,83 \pm 0,69 \mu\text{mol/gHb}$) lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol.

Berdasarkan hasil analisis data GSH sel eritrosit dengan menggunakan t-test didapatkan adanya beda bermakna antara kelompok P2 dibandingkan dengan P1 ($p=0,023$).

BAB 6

PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian provitamin B5 pada pertumbuhan *Plasmodium berghei* dan kadar GSH eritrosit mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei*. Untuk memenuhi tujuan dalam penelitian ini digunakan model infeksi *Plasmodium falciparum* pada manusia dengan menggunakan mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* (LUMC, 2002). Pertumbuhan *Plasmodium berghei* diukur dengan menggunakan parameter parasitemia, yaitu sel eritrosit yang terinfeksi yang ditemukan pada pemeriksaan hapusan darah .

Penggunaan *Plasmodium berghei* sebagai model infeksi pada berbagai penelitian tentang pengaruh suatu senyawa terhadap *Plasmodium falciparum* secara *invivo* yang tidak memungkinkan dilakukan pada manusia karena permasalahan etika. *Plasmodium berghei* dijadikan model infeksi *Plasmodium falciparum* karena mempunyai kemiripan secara biologis (proses metabolisme siklus hidup dan gambaran mikroskopis). Dalam gambaran mikroskopis pola infeksi pada eritrosit oleh *Plasmodium berghei* sama dengan *Plasmodium falciparum* yang tidak didapatkan pada infeksi oleh species *Plasmodium* yang lain adalah infeksi oleh lebih dari satu parasit dalam satu sel eritrosit (lihat gambar 5.1).

Pada penelitian ini hewan percobaan (mencit Balb/C jantan yang berumur 8-10 minggu) dibuat menderita malaria dengan menyuntikkan 200 μ L darah mencit Balb/C donor yang mengandung $2,5 \times 10^6$ *Plasmodium berghei*

(Berberian and Slighter, 1973). Setiap hari sebelum perlakuan dilakukan pemeriksaan parasitemia untuk mengetahui waktu memulai perlakuan. Pada pemeriksaan awal sebelum diberikan perlakuan pemberian provitamin B5 (D0) rata-rata tingkat parasitemia (dinyatakan dalam %) 2,54 (pemeriksaan kurang lebih 40 jam setelah infeksi) . Keadaan awal parasitemia ini tidak homogen ($F=3,501$). Perlakuan mulai diberikan pada tingkat parasitemia 1-5 %. Tingkat parasitemia yang homogen sulit didapatkan pada infeksi dengan plasmodium berkenaan dengan perbedaan respon inang terhadap parasit sebagai salah satu patogenesis terjadinya malaria (White, 1991). Perlakuan yang homogen sudah dilakukan dengan mencampur seluruh darah dari mencit Balb/C donor dan volume penyuntikan darah donor ke mencit Balb/C percobaan yang sama, yaitu 200 μ L.

Pada penelitian ini dilakukan penimbangan berat badan mencit Balb/C yang bertujuan untuk mendapatkan data berat badan mencit, untuk memonitor gejala toksisitas pada pemberian provitamin B5. Penurunan berat badan dan gejala gastrointestinal adalah gejala toksik pemberian provitamin B5 (Expert Committee on Vitamin and Minerals, 2002). Pada penelitian ini penurunan berat badan karena gejala toksisitas dengan penurunan berat badan karena infeksi *Plasmodium berghei* sangat sulit untuk dibedakan. Malaria juga memberikan gejala gastrointestinal dan penurunan nafsu makan yang mengakibatkan penurunan berat badan. Dari analisis statistik dengan membandingkan antara berat badan sebelum perlakuan dengan berat badan sesudah perlakuan tidak didapatkan beda yang bermakna ($p=0,416$).

Berat badan juga menjadi faktor internal pada hewan coba yang dapat mempengaruhi hasil-hasil eksperimen selain usia, jenis kelamin, sifat genetik, status kesehatan, dan luas permukaan tubuh. Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi hasil penelitian diantaranya adalah kondisi kandang, suasana asing atau baru, penempatan hewan, keadaan ruangan tempat hidup seperti suhu, kelembaban, ventilasi, cahaya dan kebisingan (Wattimena, 1993). Faktor-faktor di atas dalam penelitian ini dieliminasi dengan memilih hewan coba dengan usia dewasa (8 – 10 minggu) sehingga diharapkan respons imunologik terhadap keberadaan parasit menjadi sama. Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan yang sehat, ditandai dengan bulu licin, tebal dan mengkilat; hewan harus terlihat aktif dan bila dipegang badan tidak terasa kurus (Smith, Mangkoewidjojo, 1988). Berat badan antar hewan coba yang digunakan sebelum perlakuan tidak berbeda bermakna ($p=409$), sehingga diharapkan tidak mempengaruhi hasil penelitian.

Rute pemberian obat sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Slyshencov (1998) yaitu *per os*. Dengan pemberian *per os* dosis yang diterima oleh masing-masing hewan coba akan sesuai dengan yang diperlukan. Volume larutan yang diberikan masih dalam batas yang dapat diterima oleh lambung yaitu sampai volume 1000 μL dan tidak menyebabkan regurgitasi. (Wattimena, 1993). Observasi selama penelitian tidak didapatkan regurgitasi setelah sonde provitamin B5. Kesamaan stresor yang diberikan kepada semua hewan coba merupakan faktor yang harus ada, sehingga dalam penelitian ini kelompok kontrol juga diberikan jenis stresor yang sama dengan kelompok

perlakuan dengan memberikan sonde pelarut provitamin B5 yaitu aquades dengan volume 400 μL .

Penentuan dosis pada penelitian ini berdasarkan penelitian Saliba *et al.* (2004) yang menemukan dosis efektif untuk penurunan tingkat parasitemia yaitu 1,4 g/kgBB/hari sebagai kelompok perlakuan 1. Pada kelompok perlakuan 2 digunakan dosis 5,6 g/kgBB/hari, merupakan dosis yang lebih besar dari dosis efektif dan belum termasuk dosis toksik untuk mencit yaitu 10 g/kgBB/hari (Expert Committee on Vitamins and Minerals, 2001). Dosis P1 yang digunakan dalam penelitian ini juga memenuhi dosis efektif untuk senyawa antimalaria dari golongan analog asam pantotenat (Kirk, 2005), yaitu 15-200 μM atau setara dengan 3,075-41 mg. Dosis 1,4 g/kgBB/hari untuk mencit setara dengan 28 mg, sedangkan dosis 5,6 g/kgBB/hari untuk mencit setara dengan 111 mg empat kali lebih besar dari dosis efektif analog asam pantotenat.

Pada perhitungan tingkat parasitemia sehari (24 jam) setelah pemberian provitamin B5 yang terakhir (Kalra BS, 2006), didapatkan parasitemia yang paling rendah terjadi pada dosis 1,4 g/kgBB/hari dibandingkan dengan semua kelompok dalam penelitian, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Saliba *et al.* (2004) tentang dosis efektif untuk menurunkan parasitemia pada infeksi parasit. Sedang pada kelompok P2 tingkat parasitemia tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,689$). Pada kelompok P1 terdapat beda yang bermakna ($p=0,000$) dibandingkan kontrol.

Hambatan pertumbuhan parasit (%) pada P1 sebesar 61,9 % berbeda dengan yang didapatkan oleh Saliba *et al.* (2004), yaitu hambatan parasitemia hingga 85 % pada pemberian peroral. Perbedaan tersebut terjadi karena perbedaan

waktu memulai perlakuan pemberian provitamin B5. Saliba *et al.* (2004) memulai perlakuan 2 – 4 jam setelah penyuntikan parasit, pada saat itu merozoit baru dilepaskan dari hepatosit (1,5 jam setelah injeksi parasit) (Knirsh, 2003). Pada keadaan parasitemia yang paling rendah tersebut, produksi KoA untuk pertumbuhan parasit mulai dihambat, sehingga sangat efektif untuk menurunkan tingkat parasitemia. Sedangkan pada penelitian ini perlakuan dimulai pada tingkat parasitemia 1-5 % (\pm 40 jam setelah injeksi parasit).

Tingkat parasitemia kelompok P2 tidak didapatkan beda yang bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,689$). Kelompok P2 yang diberikan dosis provitamin B5 sebanyak 5,6 g/kgBB/hari tidak menunjukkan hambatan pertumbuhan parasit yang bermakna, kondisi ini terjadi karena pengaruh faktor GSH sebagai akibat pemberian provitamin B5 dan konversi provitamin B5 menjadi vitamin B5 (asam pantotenat). Provitamin B5 merupakan suatu inhibitor kompetitif bagi enzim pantotenat kinase, sehingga jika jumlah provitamin B5 yang diambil oleh sel parasit sudah maksimal untuk berikatan dengan enzim pantotenat kinase, maka sisa provitamin B5 yang dikonversi menjadi bentuk asam pantotenat menjadi lebih banyak. Asam pantotenat ini yang diambil oleh sel parasit dan digunakan untuk membentuk KoA yang justru akan memacu pertumbuhan parasit (Ginsburg, 2002; Sherman, 1979). Pembentukan KoA pada tingkat parasitemia yang tinggi akan semakin dipacu dengan meningkatnya ketersediaan sistein dari hasil degradasi hemoglobin oleh parasit.

Untuk menurunkan tingkat parasitemia pada pemberian provitamin B5 harus mempertimbangkan dosis dan waktu pemberian. Pada dosis yang lebih tinggi dari dosis efektif (pada penelitian ini dosis 5,6 g/kgBB/hari), cenderung

terjadi peningkatan parasitemia dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada penelitian ini variabel waktu pemberian untuk menentukan sejauh mana metabolit hasil konversi provitamin B5 (vitamin B5) mempengaruhi efek penghambatan pertumbuhan tidak diteliti. Pengaruh meningkatnya kadar GSH dan meningkatnya konversi provitamin B5 menjadi vitamin B5 pada pemberian provitamin B5 pada dosis yang lebih besar dari dosis efektif memerlukan penelitian lebih lanjut.

Penentuan kadar GSH sel eritrosit memerlukan data kadar hemoglobin sebagai faktor koreksi (Chavan, 2006). Penurunan kadar hemoglobin akan menurunkan jumlah sel eritrosit (Kuswarini, 1998), dengan menurunnya jumlah eritrosit berarti kadar GSH sel eritrosit yang terukur juga rendah.

Pada infeksi malaria terjadi penurunan kadar GSH pada sel eritrosit yang terinfeksi dibandingkan dengan eritrosit yang normal (Atamna H and Ginsburg, 1997), pada penelitian ini dilakukan penelitian kadar GSH eritrosit keseluruhan tidak dibedakan antara eritrosit yang normal dengan yang terinfeksi. Jika kadar GSH eritrosit yang normal = 13,333 $\mu\text{mol/gHb}$ (Baynes and Dominickzak, 2003) maka GSH eritrosit yang terukur dalam penelitian ini mengalami penurunan rata-rata 31 kali lebih rendah. Penurunan kadar GSH sel eritrosit ini bisa berasal dari stresor yang besar yang diterima oleh mencit Balb/C selama penelitian. Selain karena infeksi oleh parasit yang meningkatkan pemakaian GSH sel eritrosit, perlakuan dengan memasukkan sonde dan pemindahan berkali-kali juga merupakan stresor yang mempengaruhi hasil penelitian.

Penurunan GSH sel eritrosit ini masih lebih tinggi jika dibandingkan hasil yang diperoleh oleh Atamna and Ginsburg (1997), yaitu lebih rendah 60 kali GSH eritrosit yang normal. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan karena dalam

penelitian ini tidak dibedakan antara GSH yang berasal dari sel eritrosit dan GSH yang berasal dari sel parasit. Sedangkan pada penelitian oleh Atamna and Ginsburg (1997) mereka membedakan antara GSH yang berasal dari sitosol sel eritrosit dengan yang berasal dari kompartemen parasit. Kecenderungan peningkatan kadar GSH sel eritrosit pada dosis 5,6 g/kgBB/hari yang setara dengan pemberian 111 mg provitamin B5 pada mencit Balb/C dengan berat badan 20 g, hal ini tidak sejalan dengan penelitian Slyshencov (1998) tentang efek perlindungan pantotenol terhadap pengaruh sinar gamma pada sel yaitu peningkatan kadar GSH sel pada kelompok perlakuan dimulai pada dosis provitamin B5 sebanyak 26 mg/hari pada tikus.

GSH memegang peranan di dalam sistem antioksidan dan polimerisasi heme bebas yang terbentuk pada infeksi malaria sebagaimana tampak pada fungsi GSH dalam infeksi malaria sebagai berikut: melindungi sel eritrosit dari stres oksidatif, berperan dalam katabolisme hem, mempengaruhi pertumbuhan parasit (Ayi Kodjo *et al.*, 1998).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian provitamin B5 meningkatkan kadar GSH sel, diantaranya pemberian provitamin B5 (panthenol) 26 mg/hari pada tikus meningkatkan kadar GSH sel hepatosit tikus yang dipapar radiasi sinar γ (Slyshencov, 1998) dan penelitian sejenis yang dilakukan secara invitro oleh Slyshencov (2004). Pada penelitian ini dosis efektif untuk menurunkan tingkat parasitemia tidak jauh berbeda dengan dosis yang digunakan oleh Slyshencov. Jika dikonversikan ke dalam berat badan mencit Balb/C 20 g, maka pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari menjadi 28 mg/hari, pada dosis ini tidak didapatkan peningkatan kadar GSH sel eritrosit.

Kadar GSH sel eritrosit yang tertinggi didapatkan pada kelompok dosis P2 dengan rata-rata $0,826 \pm 0,69 \mu\text{mol/gHb}$ tidak berbeda dengan kontrol $0,417 \pm 0,34 \mu\text{mol/gHb}$. Peningkatan kadar GSH sel eritrosit pada kelompok P2 tidak diikuti dengan penurunan tingkat parasitemia. Hal tersebut kemungkinan terjadi melalui mekanisme sebagaimana penelitian yang dilakukan oleh Slyshencov *et al.* (1998) didapatkan bahwa pemberian 26 mg/hari provitamin B5 (Panthenol) akan meningkatkan jumlah asam pantotenat di dalam tubuh yang akan memberi pengaruh sebaliknya terhadap parasit, yaitu akan meningkatkan pertumbuhan dengan memacu pembentukan KoA (Ginsburg, 2004). Mekanisme kedua adalah peningkatan dosis provitamin B5 akan meningkatkan kadar GSH. Peningkatan kadar GSH melalui pemberian provitamin B5 ini adalah melalui stimulasi sintesis, peningkatan daur ulang dari keadaan teroksidasi menjadi keadaan tereduksi dan melalui peningkatan masukan GSH dari luar sel (Slyshencov, 2004). Dalam keadaan normal GSH dalam sel eritrosit mampu melindungi protein membran sel eritrosit dan hemoglobin dari stres oksidatif dan akibat lebih jauh adalah melindungi sel eritrosit dari hemolisis (Dumaswala UJ *et al.*, 2001; Tiley, 2001). Pada penelitian ini dengan hasil penurunan kadar GSH dibandingkan dengan GSH eritrosit yang normal, keadaan ini tidak mampu melindungi membran sel eritrosit dari hemolisis.

Dalam penelitian ini terlihat adanya hubungan tingkat parasitemia dan kadar GSH sel eritrosit. Peningkatan persen parasitemia cenderung terjadi pada kadar GSH sel eritrosit yang tinggi, hasil serupa juga didapatkan oleh Kodjo Ayi *et al* (1998).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Kodjo Ayi *et al.* (1998) tentang hubungan antara kadar GSH dengan pertumbuhan parasit yang diukur dengan tingkat parasitemia didapatkan hasil bahwa tingkat parasitemia menurun pada keadaan kadar GSH yang rendah. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian ini, yang terlihat pada kelompok P2 dengan peningkatan kadar GSH juga diikuti dengan peningkatan tingkat parasitemia.

Peningkatan kadar GSH intraseluler pada pemberian provitamin B5 yang mengakibatkan meningkatnya pembentukan hemozoin. Peningkatan hemozoin akan mengurangi stres oksidatif karena berkurangnya Fe^{3+} yang potensial menghasilkan radikal bebas melalui reaksi Fenton-Haberweiss. Stres oksidatif adalah salah satu mekanisme yang dapat membunuh Plasmodium di dalam sel eritrosit (Dockrell, 1983). Pada akhirnya peningkatan kadar GSH intraseluler akan memberikan perlindungan kepada Plasmodium, dan hasil konversi provitamin B5 menjadi vitamin B5 mengakibatkan meningkatnya pertumbuhan Plasmodium. Karena kisaran dosis yang digunakan dalam penelitian ini sangat sempit dan variasinya sedikit, yaitu 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari, sehingga untuk memperkuat penjelasan mekanisme peningkatan GSH ini memerlukan penelitian lanjutan dengan dosis yang lebih bervariasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa provitamin B5 mempunyai peluang untuk menjadi senyawa antimalaria pada dosis 1,4 g/kgBB/hari. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kirk *et al.* (2005), dinyatakan bahwa suatu senyawa analog asam pantotenat dapat direkomendasikan sebagai antimalaria jika mampu menghambat 50 % pertumbuhan parasit dan terletak pada dosis efektif 15-200 μ M (3,075-41 mg).

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini masih jauh dari kondisi ideal yang diharapkan terutama pada pengukuran kadar GSH eritrosit. Kadar GSH eritrosit yang terukur seharusnya murni yang berasal dari eritrosit, tidak tercampur dengan GSH yang berasal dari parasit. Keadaan ini tidak dapat terpenuhi dalam penelitian ini karena adanya beberapa keterbatasan diantaranya adalah keterbatasan metode pemeriksaan yang digunakan, sehingga tidak mampu dibedakan antara GSH parasit dengan GSH eritrosit dan keterbatasan dana untuk melakukan metode pemisahan GSH dari kedua kompartemen tersebut. Keterbatasan ini memerlukan penyempurnaan pada penelitian selanjutnya.

BAB 7**PENUTUP****7.1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap tingkat parasitemia dan GSH sel eritrosit mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* pada pemberian provitamin B5 dosis 1,4 g/kgBB/hari dan dosis 5,6 g/kgBB/hari, maka dapat disimpulkan :

1. Pemberian 1,4 g/kgBB/hari provitamin B5 pada mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*, sedangkan pemberian 5,6 g/kgBB/hari provitamin B5 tidak terjadi hambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*.
2. Pemberian provitamin B5 1,4 g/kgBB/hari pada mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* tidak meningkatkan kadar GSH sel eritrosit, sedangkan pemberian provitamin B5 5,6 g/kgBB/hari pada mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* meningkatkan kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C.
3. Pemberian provitamin B5 pada mencit Balb/C yang terinfeksi *Plasmodium berghei* memerlukan dosis optimum untuk menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

7.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian terhadap tingkat parasitemia, GSH sel eritrosit pada pemberian provitamin B5, maka disarankan sebagai berikut :

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang efektifitas pemberian provitamin B5 sebagai antimalaria dengan dosis yang lebih bervariasi.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme peningkatan GSH sel eritrosit pada pemberian provitamin B5.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kadar GSH sel eritrosit yang terpisah dari kadar GSH sel parasit.

DAFTAR PUSTAKA

- Abiko, Y. 1975. Metabolism of coenzyme A. *in* D. M. Greenberg, ed. Metabolism of sulphur compounds, New York: New York Academic Press. pp 1–25
- Basu Sanjay, 2004, Eradicating Malaria in Poor Nations: The Potential of Vector Control Measures and Vaccine Development, Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology Press.
- Baynes J, Dominickzak H.M, 2002, Anaerobic Metabolism of Glucose in the Red Cell, *in* Medical Biochemistry capter 11, USA: Mosby International Ltd, pp 125-136.
- Berberian AD, Sligther GR, 1973, Chemotherapeutic Activity of Combination Doses of Chloroquine, Pyrimethamine, and Sulfamethoxydiazine, a Long-acting Sulfanilamide, Against *Plasmodium berghei* Infections in Mice, *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 3:392-498.
- Biot C, Dessolin J, Grellier P, Davioud-Charvet E, 2003, Double-drug development against antioxidant enzymes from *Plasmodium falciparum*, *Redox Rep.* 8: 280-283.
- Bozdech Z, Ginsburg H, 2004, Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*—data mining of the transcriptome, *Malaria Journal* 3:23.
- Carucci DJ, Gardner MJ, Tettelin Herve, Cummings ML, Smith OH, Adams MD, Hoffman SI, Craig J, 1998, The *Plasmodium falciparum* Life Cycle, *in* <http://www-ermm.cbcu.com.ac.uk> diakses tanggal 10 Februari 2006
- Chai Christina L. L, Spry Christina, Kirk K, and Saliba KJ, 2005, A Class of Pantothenic Acid Analogs Inhibits *Plasmodium falciparum* Pantothenate Kinase and Represses the Proliferation of Malaria Parasites, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:4649-4657
- Chavan NS, 2005, Reduced Glutathione: The Importance of Sample Collections, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 20: 150-152.
- Chereson, Rasma, 1999, Bioavailability, Bioequivalence and Drug Product Selection, dari <http://kiwi.creighton.edu/pkinbook/> diakses tanggal 12 Nopember 2006.
- Cielecka and Salamatin Ruslan, 2005, *The Plasmodium berghei* diakses dari [http://www..ib.amwaw.edu.pl/biologia/DC/P.berghei/1_1_01.html](http://www.ib.amwaw.edu.pl/biologia/DC/P.berghei/1_1_01.html) diakses tanggal 30 Mei 2006.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2003, Modul Promosi Gebrak Malaria dari <http://www.depkes.go.id> diakses tanggal 31 Mei 2004.
- D.F.N. Platel, F Mangaou and J. Tribouley-Duret, 1999, Role of glutathione in the detoxification of ferriprotoporphyrin IX in chloroquine resistant *Plasmodium berghei*, *Molecular and Biochemical Parasitology* 98:215-223.
- Divo AAT, Geary TG, Davis Nland Jensen JB, 1985, Nutritional Requirement of *Plasmodium falciparum* in Culture *J. Protozool* 32:59-64
- Droge, Wulf, 2002, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol. Rev.* 82: 47-95
- Dubois VL, Platel DF, Pauly G, Tribouley-Duret J, 1995, *Plasmodium berghei*: implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance in vivo. *Exp. Parasitology* 81 (1):117-124.
- Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, Nair PNM, Shertzer HG, Dibello P, Jacobsen DW, 2001, Glutathione Protects chemokine-scavenging and Oxidative Defense Functions in Human RBCs, *Am J Physiol Cell Physiol* 280:867-873.
- Ekvall H, Premji Zul, Bennet Steve and Bjorkman Anders, 2001, Hemoglobin Concentration In Children In A Malaria Holoendemic Area Is Determined By Cumulated *Plasmodium Falciparum* Parasite Densities, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64 : 58-66.
- Expert Group on Vitamins and Minerals, 2001, Review of Pantothenic Acid, London in Panacid.PDF diakses tanggal 14 Desember 2005.
- Foldes J, Matyi A, Matkovics B, 1994, The role of free radicals and antioxidative enzymes in erythrocytes and liver cells in the course of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei* infection of mice, *Acta Microbiology Immunology Hungary* 41:153-161.
- Food and Nutrition Board – Institute of Medicine. (2000). Dietary reference intakes. Thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academy Press: Washington DC.
- Genschel Ulrich, 2004, Coenzyme A Biosynthesis: Reconstruction of the Pathway in Archaea and an Evolutionary Scenario Based on Comparative Genomics, *Mol. Biol. Evol.* 21: 1242-1251
- Ginsburg Hagai, 2004, *Plasmodium* Metabolic Pathway : CoA Biosynthesis, in <http://www.huji.ac>, diakses Desember 2005.

- Ginsburg H and Atamna H, 1997, The malaria parasite supplies glutathione to its host cell-- investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*, *European Journal of Biochemistry* 250: 670-679.
- Higgins J. and Kleinbaum DG., 1985, Determining Sample Size in Introduction to Randomized Clinical Trial, USA: Family Health International p.24-25.
- Hughes HL Peter, And Clark IA., 1985, Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells, *Blood First Edition Paper*, prepublished online January 16, 2003.
- Hughes Peter, Stocker Roland, Hunt Nicholas, Buffinton Gary, Weidemann Maurice, 1985, Oxidative Stress and Protective Mechanism in Erythrocytes in Relation to *Plasmodium vinckei* load, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:548-551.
- Kakkilaya BS, 2003. Diagnosis of Malaria, dalam www.malariasite.com, diakses tanggal 10 Februari 2005.
- Kalra BS, Chawla S, Gupta P, Valecha N, 2006, Screening of Antimalarial Drugs : An Overview, *Indian Journal of Pharmacology* 38 :5-12.
- Kirk K., Spray Christina, Chai C., Saliba KJ., A Class of Pantothenic Acid Analogs Inhibits *Plasmodium falciparum* Pantothenate Kinase and Represses the Proliferation of Malaria Parasites, *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 49 (11): 4649-4657
- Kleinkauf, H. 2000. The role of 4'-phosphopantetheine in the biosynthesis of fatty acids, polyketides and peptides. *Biofactors* 11: 91-92.
- Knirsh, Charles, 2003, *Parasitology Transcript 5: Introduction to Protozoa: Malaria*, USA: Columbia University Press.
- Kuswarini S, 1998. Pengaruh Konsumsi Tempe Kedelai atau Kedelai sebagai Sumber Utama Protein Terhadap Kadar Hemoglobin dan Volume Eritrosit Rata-Rata dalam Darah Tikus dengan Keadaan Defisiensi Besi. Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Lew VL, Tiffert Teresa and Ginsburg Hagai, 2003, Excess Haemoglobin Digestion and The Osmotic Stability, *Malaria Journal* 82:548-551.
- Leidin University Medical Center, 2002, The *Plasmodium berghei* Research Model of Malaria dalam www.lumc.nl/1040/research/malaria/model05.html. Diakses tanggal 24 Januari 2006.

- Mae Hong Son, Mae Sod, 2002, Laboratory Manual For Laboratory Technician Training, Thailand: Shoklo Malaria Research Unit.
- Mayes A. Peter, PhD, 2003, Lintasan Pentosa Fosfat dan Lintasan Lainnya dalam Metabolism Heksosa, dalam Biokimia Harper edisi 25 bab 22, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hlm 206-216
- McKerrow H.J, Stephen DJ.,2001,Parasitic Disease, Medical Immunology 10th.ed. USA: Lange Medical Book.
- Miller, S. L., and G. Schlesinger. 1993. Prebiotic Syntheses of Vitamin Coenzymes: Pantoic Acid, Pantothenic Acid, and The Composition of Coenzyme A. J. Mol. Evol. 36 : 308-314.
- Muller, S. 2003, Thioredoxin reductase and glutathione synthesis in Plasmodium falciparum, Redox Rep. Journal 8: 251-255.
- Nunilon ES, 1992, Malaria Vaccine: Recent Development, Phil. J Microbiol 22:1-3
- Ohio State University, 2005, *Plasmodium* spp, dalam <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/plasmodium.html>, diakses bulan Oktober 2005.
- PATH, 1997, Anemia Detection Method For Low Resource Setting: A Manual For Health worker, diakses dari <http://www.path.org> pada tanggal 20 Juni 2006.
- Path, 2005, Parasitology Practical Note, The Lifecycle of Plasmodium spp dalam http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/Parasitology_Practicals/Malaria_Lifecycle, diakses tanggal 3 Nopember 2005.
- Pdrhealth, 2005, Pantothenic Acid, dalam http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/pan_0196.shtml, diakses bulan Nopember 2005.
- Rowland, Malcolm&Tozer, NT., 1989, Clinical Pharmacokinetics Concepts and Application 2nd. edition, USA: Lea&Febiger, p.101-129
- Saliba KJ, Horner HA, Kirk Kiaran. 1998, Transport and Metabolism of the Essential Vitamin Pantothenic Acid in Human Erythrocyte Infected with the Malaria Parasite Plasmodium falciparum, J. Biol Chem 273:17.
- Saliba KJ, Ferru Isabelle, Kirk Kiaran, 2004, Provitamin B5 (Pantothenol) Inhibits Growth of the Intraerythrocytic Malaria Parasite, J. Biol Chem. 2:632-637.
- Sherman.W, Irwin, 1979, Biochemistry of Plasmodium (Malarial Parasites), Microbiological Review 43 :453-495.

- Siddiqi NJ, Alkhomida AS, 1999, Status of hepatic oxidative stress and antioxidant defense systems during chloroquine treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infected mice, *In Vivo Journal* 13: 547-550.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1988, *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*, Jakarta, UI Press hlm 11-36.
- Sullivan DJ, 2005, *Hemozoin : A Biocrystal Synthesized during Degradation of Haemoglobin*, USA, John Hopkins Univ. Press pp 130-156.
- Suryohudoyo Purnomo,, 2000, *Oksidan Antioksidan dan Radikal Bebas*, *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*, Jakarta: infomedika hlm 31-47.
- Slyshenkov VS., Omelyanchik SN, Moiseenok AG., Trebukhina RV. and Wojtczak Lech, 1998, Pantothenol Protects Rats Against Some Deleterious Effects of Gamma Radiation, *Free Radical Biology and Medicine* 26 : 894-899
- Slyshenkov VS., Dymkowska Dorota and Wojtczak Lech, 2004, Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics, *Free Radical Biology and Medicine* 269:169-172
- Tanneur Valérie, 2005, *Malaria and Host Erythrocyte Channels*, Dissertation, Universität Tübingen, Germany.
- Ullman, Buddy, 2005, *Malaria Pathogenesis : Biochemistry of Plasmodium*, diakses 20 Januari 2006 dari <http://www.ohsu.edu/biochem/faculty/ullmanlab/lectures/malaria1.pdf>
- Urdaneta L, Guevara P, Ramirz JL, 1998, Evaluation of DNA Recombinant Methodologies for the Diagnosis of *Plasmodium falciparum* and their Comparison with the Microscopy Assay, *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 93:630-646
- USNAMRU2, 2003, *Panduan Praktis Diagnosis Malaria*, Yogyakarta: Inisiatif Anti Malaria Indonesia.
- Wattimena JR, 1993, *Petunjuk Praktikum Farmakologi*, Bandung: Institut Teknologi Bandung
- White J.Nicholas, Plorde J.James, 1991, *Malaria*, *Harrison's Principles of Internal Medicine* 12th ed., USA:McGraw-Hill.Inc pp 782-788.
- Wiser MF, 2006, *Biochemistry of Plasmodium* diakses dari <http://www.ohsu.edu/biochem/lectures/malaria1.pdf> tanggal 20 Juli 2006.

World Health Organization, 2005, Roll Back Malaria in <http://www.wpro.who.int> diakses Nopember 2005.

World Health Organization, 2000, New Perspective Malaria Diagnosis, dalam http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/malaria_diagnosis.pdf diakses tanggal 10 Februari 2006.

World Health Organization, 2005, alamat http://w3.whosea.org/LinkFiles/Malaria_Malaria_Ino_os.pdf diakses tanggal 20 April 2006.

Wu Guoyao, Fang Yun-Zhong, Yang Sheng, Lupton RJ, Turner D. Nancy, 2004, Glutathione Metabolism and Its Implications for Health, *J.Nutr.* 134:489-492

Zainudin M, 2000, Metodologi Penelitian, Surabaya: Airlangga University Press.

Lampiran 1

Penelitian Pendahuluan

Tabel 9.1. Data tingkat parasitemia penelitian pendahuluan

Mencit Balb/C	Parasitemia (%)				
	Kelompok I (K.I)	Kelompok II (K.II)	Kelompok III (K.III)	Kelompok IV (K.IV)	Kelompok V (K.V)
1.	29	18,6	14,4	15,4	5,6
2.	26,8	18	18,4	11,4	4,8
3.	25,2	18,8	10,8	8	7,8
4.	30,1	19	16,8	13,2	6,2
5.	17,2	11,2	Mati	8,2	6,8
x	25,7	17,12	15,1	11,24	6,24
SD	4,56	2,8	2,86	2,86	1,02

Keterangan :

Kelompok I: Mencit Balb/C terinfeksi *Plasmodium berghei*+sonde aquades 0,3 ml

Kelompok II: Mencit Balb/C terinfeksi *Plasmodium berghei*+sonde 0,0025 g PB5

Kelompok III: Mencit Balb/C terinfeksi *Plasmodium berghei*+sonde 0,025 g PB5

Kelompok IV: Mencit Balb/C terinfeksi *Plasmodium berghei*+sonde 0,05 g PB5

Kelompok V: Mencit Balb/C terinfeksi *Plasmodium berghei*+sonde 0,25 g PB5

Perhitungan besar sampel :

1. Antara K.I dengan K.II

$$\begin{aligned}\alpha &= 0,05 & \beta &= 0,10 \\ Z\alpha &= 1,96 & Z\beta &= 1,28 \\ Xc &= 25,7 & Xt &= 17,12 \\ Sc &= 4,56 & f &= 0,2\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}N &= \frac{1}{1-0,2} \times \frac{2(1,96+1,28)^2(4,56)^2}{(25,7-17,12)^2} \\ &= 7,4\end{aligned}$$

2. Antara K.I dengan K.III

$$\begin{aligned}\alpha &= 0,05 & \beta &= 0,10 \\ Z\alpha &= 1,96 & Z\beta &= 1,28 \\ Xc &= 25,7 & Xt &= 15,1 \\ Sc &= 4,56 & f &= 0,2\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}N &= \frac{1}{1-0,2} \times \frac{2(1,96+1,28)^2(4,56)^2}{(25,7-15,1)^2} \\ &= 4,86\end{aligned}$$

3. Antara K.I dengan K.IV

$$\begin{aligned}\alpha &= 0,05 & \beta &= 0,10 \\ Z\alpha &= 1,96 & Z\beta &= 1,28 \\ X_c &= 25,7 & X_t &= 11,24 \\ S_c &= 4,56 & f &= 0,2\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}N &= \frac{1}{1 - 0,2} \times \frac{2(1,96 + 1,28)^2(4,56)^2}{(25,7 - 11,24)^2} \\ &= 2,61\end{aligned}$$

4. Antara K.I dengan K.V

$$\begin{aligned}\alpha &= 0,05 & \beta &= 0,10 \\ Z\alpha &= 1,96 & Z\beta &= 1,28 \\ X_c &= 25,7 & X_t &= 6,24 \\ S_c &= 4,56 & f &= 0,2\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}N &= \frac{1}{1 - 0,2} \times \frac{2(1,96 + 1,28)^2(4,56)^2}{(25,7 - 6,24)^2} \\ &= 1,441\end{aligned}$$

Lampiran 2

Prosedur penginfeksian mencit Balb/C dengan *Plasmodium berghei*

1. Persiapan mencit Balb/C donor
 - a. Simpanan darah beku yang mengandung parasit dicairkan pada suhu tubuh.
 - b. Mencit Balb/C donor diinjeksikan 0,2 ml simpanan darah beku yang mengandung *Plasmodium berghei* secara intraperitoneal.
 - c. Pemeriksaan hapusan darah tepi mencit donor dilakukan setiap hari sampai parasitemia mencapai 20 %.
 - d. Mencit Balb/C donor dikorbankan dan diambil darah intrakardial .
 - e. Darah diencerkan dengan alcheiver,dengan perbandingan 1:3, sehingga mengandung 5% parasit, yang setara dengan $2,5 \times 10^7$ eritrosit yang mengandung parasit/ml.
2. Penginfeksian mencit Balb/C percobaan
 - a. Setiap mencit Balb/C percobaan diinjeksikan secara intraperitoneal dengan 0,2 ml darah mencit Balb/C donor yang mengandung 5×10^6 eritrosit yang mengandung parasit/ml
 - b. Pemberian dosis obat pertama dilakukan 2 hari setelah penginfeksian atau pada saat parasitemia mencapai 1-5% (Berberian and Slighter, 1973).

Lampiran 3

Prosedur Pemberian Provitamin B5 (*The 4-Days Suppression Schizonticidal Test/Peter's Test*) :

1. Mencit Balb/C percobaan 2 hari setelah infeksi atau parasitemia mencapai 1-5 % sesudah diinfeksi siap diberikan provitamin B5.
2. Mencit Balb/C ditimbang berat badannya dan ditentukan dosis yang akan diberikan untuk masing-masing mencit pada kelompok dosis 1,4 g/kgBB/hari dan 5,6 g/kgBB/hari.
3. Provitamin B5 dilarutkan dalam aquades.
4. Provitamin B5 diberikan dengan disonde, sedang pada kelompok kontrol diberikan sonde aquades.
5. Provitamin B5 diberikan selama 3 hari dan pada hari keempat (24 jam setelah pemberian terakhir provitamin B5) dibuat hapusan darah, tetes tebal dan terminasi diikuti pengambilan darah intrakardial untuk pemeriksaan GSH (Kalra BS *et.al.*,2006).

Lampiran 4

Perhitungan Dosis Provitamin B5

1. Perhitungan dosis P1

Perhitungan dosis 1,4 g/kgBB/hari (Saliba, 2004) untuk mencit Balb/C dengan berat badan 20 gram

$$1,4 \text{ g} \times 20/1000\text{g} = 0,028 \text{ g}$$

$$= 28 \text{ mg}$$

Perhitungan dosis P1

$$1 \text{ ml stock provit (100 g/100 ml)} + 9 \text{ ml aquades} = 1000 \text{ mg/10 ml}$$

$$= 100 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Maka dosis yang diterima tiap mencit} = \frac{277 \times 100}{1000} = 27,7 \text{ mg/hari}$$

Jadi dosis sesuai dengan dosis Saliba (2004) adalah kelompok P1

2. Kelompok P2

Dari sediaan diambil 1 ml provitamin B5 ditambahkan dengan 1 ml aquades sehingga dalam 1 ml mengandung 500 mg (9 mencit Balb/C)

$$= \frac{222 \times 500}{1000} = 111 \text{ mg/hari}$$

Lampiran 5

Prosedur pembuatan tetes tebal dan hapusan darah dan pewarnaannya dengan *Giemsa*

Hapusan darah

1. Meneteskan 1-2 tetes darah dari ekor mencit yang dilukai pada gelas objek
2. Menaruh slide penghapus dan menariknya ke belakang
3. Membiarkan darah tersebar di ujung slide penghapus.
4. Mendorong slide penghapus dengan perlahan dan teratur dan mempertahankan sudutnya 45° (Mae Hong Son&Mae Sod, 2002).

Tetes tebal

1. Meneteskan 3 tetes darah di atas gelas objek
2. Mencampurnya dengan gerakan memutar kurang lebih 10 putaran dengan menggunakan ujung gelas objek.
3. Membiarkan kering pada permukaan yang rata. (Mae Hong Son&Mae Sod, 2002).

Pewarnaan :

1. Memfixasi hapusan darah dengan metanol absolut selama 2-3 detik dan membiarkan kering di udara.
2. Menuangkan larutan Giemsa di atas slide dan meratakannya.
3. Membiarkan larutan Giemsa 10 % di atas slide selama 20 menit.
4. Mencuci slide dengan air mengalir secara perlahan.
5. Membiarkan slide kering di atas rak slide. (Mae Hong Son&Mae Sod, 2002).

Lampiran 6

Pemeriksaan GSH Sel Eritrosit

Penentuan kadar GSH eritrosit dengan cara mengukur kadar GSH menurut protokol yang dilakukan oleh Anderson (1997). Prinsip metode ini adalah jika 5'5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) bereaksi dengan GSH maka akan membentuk 2,5 DTNB yang berwarna kuning. Kemudian dilihat dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu.

Prosedur pemeriksaan (Anderson, 1997):

1. 0,25ml sampel darah (*whole blood*) + Etilen Diamin Tetraasetat (EDTA) 10%
2. Sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰ C
3. Buang supernatan
4. Cuci pellet dengan 3ml larutan NaCl 0,9% hingga 3 kali
5. Tambahkan larutan 3 ml *phosphate buffered saline* (PBS) 0,01 M.
6. Sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰ C.
7. Buang larutan *buffer saline* yang bersih pada bagian atas
8. Pellet diaduk dan ditambah *aquadest* dingin ad 2 ml
9. Vortex
10. Simpan dalam lemari pendingin <-80⁰ C sampai digunakan
11. Ambil 1ml hemolisat.
12. Tambahkan 1ml *Sulphosalisilic Acid* (SSA) 4,1%
13. Sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰ C.

14. Ambil 1 ml supernatan (apabila masih keruh saring dengan menggunakan kertas saring *whatman* 42)
15. Tambahkan 0,25 ml DTNB 1 M
16. Tambahkan buffer fosfat KCl 1,17% sampai volume 3ml
17. Inkubasi pada suhu 37⁰C selama 5-10 menit
18. Baca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 415 nm.

Lampiran 7

Pemeriksaan hemoglobin

Pemeriksaan hemoglobin dilakukan dengan metode "*colorimetry-cyanmethemoglobin method*" atau metode sianmethemoglobin. Prinsip pemeriksaan ini adalah darah yang telah ditambahkan larutan Drabkin's, sel eritrositnya akan mengalami hemolisis dan hemoglobinnya akan diubah menjadi sianmethemoglobin. Sampel darah kemudian diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu.

Prosedur pemeriksaan :

1. Memasukkan 0,02 ml darah ke dalam kuvet yang bersih.
2. Menambahkan 5 ml larutan Drabkin's dan diaduk rata.
3. Membiarkan larutan pada suhu ruangan selama 5 menit.
4. Memeriksa kadar hemoglobin dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (PATH,1997)

Lampiran 8

Data Hasil Penelitian Dan Analisis Data Hasil Penelitian

Hipotesis penelitian:

1. Hipotesis nihil H_0 : Tidak ada perbedaan bermakna pertumbuhan parasit kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Hipotesis alternatif H_1 : Ada perbedaan bermakna pertumbuhan parasit kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

2. Hipotesis nihil H_0 : Tidak ada perbedaan bermakna kadar GSH sel eritrosit kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Hipotesis alternatif H_1 : Ada perbedaan bermakna kadar GSH sel eritrosit kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Uji Normalitas Data

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	BB1	BB2	BB3	BB4	GSH	D0	D4	PERTMBH	INHIB	
N	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
Normal Parameters	Mean	27.5000	27.6250	27.3750	27.2083	.4813	2.5417	14.9217	12.3792	21.2250
	Std. Deviation	3.24372	3.13206	3.09013	2.81269	.50284	1.09223	5.83822	5.93855	37.23806
Most Extreme Differences	Absolute	.072	.173	.162	.179	.267	.109	.119	.169	.140
	Positive	.064	.099	.088	.119	.267	.109	.119	.131	.080
	Negative	-.072	-.173	-.162	-.179	-.218	-.079	-.118	-.169	-.140
Kolmogorov-Smirnov Z	.352	.846	.791	.876	1.308	.534	.584	.826	.685	
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.472	.559	.427	.065	.938	.885	.503	.736	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Hasil Penimbangan berat badan mencit Balb/C

Tabel 9.2. Berat badan hari I

Replikasi	Berat badan (gram)		
	Kontrol	P1	P2
1	30	25	29
2	30	27	31
3	31	32	28
4	29	28	26
5	28	27	22
6	25	26	24
7	31	27	34
8	26	21	23

Tabel 9.3. Berat badan hari II

Replikasi	Berat badan (gram)		
	Kontrol	P1	P2
1	30	26	29
2	29	28	31
3	30	33	28
4	29	29	27
5	28	28	22
6	26	26	24
7	30	28	33
8	26	22	21

Tabel 9.4. Berat badan hari III

Replikasi	Berat badan (gram)		
	Kontrol	P1	P2
1	30	26	29
2	29	28	31
3	30	32	27
4	29	29	27
5	29	27	22
6	26	26	23
7	30	28	31
8	26	21	21

Tabel 9.5. Berat badan hari IV

Replikasi	Kelompok		
	BB Kontrol (gram)	BB P1 (gram)	BB P2 (gram)
1	29	27	29
2	29	28	30
3	30	31	28
4	28	29	27
5	29	27	22
6	26	26	23
7	30	27	30
8	25	21	22

Perbandingan berat badan antar kelompok perlakuan

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BB hari I								
Kontrol	8	28.7500	2.25198	.79620	26.8673	30.6327	25.00	31.00
P1	8	26.6250	3.06769	1.08459	24.0603	29.1897	21.00	32.00
P2	8	27.1250	4.15546	1.46918	23.6509	30.5991	22.00	34.00
Total	24	27.5000	3.24372	.66212	26.1303	28.8697	21.00	34.00
BB hari II								
Kontrol	8	28.5000	1.69031	.59761	27.0869	29.9131	26.00	30.00
P1	8	27.5000	3.11677	1.10195	24.8943	30.1057	22.00	33.00
P2	8	26.8750	4.25735	1.50520	23.3158	30.4342	21.00	33.00
Total	24	27.6250	3.13206	.63933	26.3024	28.9476	21.00	33.00
BB hari III								
Kontrol	8	28.6250	1.68502	.59574	27.2163	30.0337	26.00	30.00
P1	8	27.1250	3.13676	1.10901	24.5026	29.7474	21.00	32.00
P2	8	26.3750	3.96187	1.40073	23.0628	29.6872	21.00	31.00
Total	24	27.3750	3.09013	.63077	26.0702	28.6798	21.00	32.00
BB hari IV								
Kontrol	8	28.2500	1.83225	.64780	26.7182	29.7818	25.00	30.00
P1	8	27.0000	2.87849	1.01770	24.5935	29.4065	21.00	31.00
P2	8	26.3750	3.50255	1.23834	23.4468	29.3032	22.00	30.00
Total	24	27.2083	2.81269	.57414	26.0206	28.3960	21.00	31.00

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BB hari I	1.685	2	21	.210
BB hari II	2.503	2	21	.106
BB hari III	2.628	2	21	.096
BB hari IV	2.268	2	21	.128

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BB hari I	Between Groups	19.750	2	9.875	.933	.409
	Within Groups	222.250	21	10.583		
	Total	242.000	23			
BB hari II	Between Groups	10.750	2	5.375	.525	.599
	Within Groups	214.875	21	10.232		
	Total	225.625	23			
BB hari III	Between Groups	21.000	2	10.500	1.110	.348
	Within Groups	198.625	21	9.458		
	Total	219.625	23			
BB hari IV	Between Groups	14.583	2	7.292	.915	.416
	Within Groups	167.375	21	7.970		
	Total	181.958	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
BB hari I	Kontrol	P1	2.1250	1.62660	.206	-1.2577	5.5077
		P2	1.6250	1.62660	.329	-1.7577	5.0077
	P1	Kontrol	-2.1250	1.62660	.206	-5.5077	1.2577
		P2	-.5000	1.62660	.762	-3.8827	2.8827
	P2	Kontrol	-1.6250	1.62660	.329	-5.0077	1.7577
		P1	.5000	1.62660	.762	-2.8827	3.8827
BB hari II	Kontrol	P1	1.0000	1.59939	.539	-2.3261	4.3261
		P2	1.6250	1.59939	.321	-1.7011	4.9511
	P1	Kontrol	-1.0000	1.59939	.539	-4.3261	2.3261
		P2	.6250	1.59939	.700	-2.7011	3.9511
	P2	Kontrol	-1.6250	1.59939	.321	-4.9511	1.7011
		P1	-.6250	1.59939	.700	-3.9511	2.7011
BB hari III	Kontrol	P1	1.5000	1.53772	.340	-1.6979	4.6979
		P2	2.2500	1.53772	.158	-.9479	5.4479
	P1	Kontrol	-1.5000	1.53772	.340	-4.6979	1.6979
		P2	.7500	1.53772	.631	-2.4479	3.9479
	P2	Kontrol	-2.2500	1.53772	.158	-5.4479	.9479
		P1	-.7500	1.53772	.631	-3.9479	2.4479
BB hari IV	Kontrol	P1	1.2500	1.41158	.386	-1.6855	4.1855
		P2	1.8750	1.41158	.198	-1.0605	4.8105
	P1	Kontrol	-1.2500	1.41158	.386	-4.1855	1.6855
		P2	.6250	1.41158	.662	-2.3105	3.5605
	P2	Kontrol	-1.8750	1.41158	.198	-4.8105	1.0605
		P1	-.6250	1.41158	.662	-3.5605	2.3105

GSH sel eritrosit

Tabel 9.6. Hasil pengukuran kadar GSH sel eritrosit mencit Balb/C pada pemberian provitamin B5.

Replikasi	Kadar GSH sel eritrosit ($\mu\text{mol/gHb}$)		
	Kontrol	P1	P2
1	0.0903	0.1367	2.3367
2	0.2423	0.1597	1.2865
3	0.1663	0.1452	0.7955
4	0.8161	0.2171	0.716
5	0.4411	0.2141	0.4599
6	1.0507	0.3179	0.2764
7	0.2492	0.2142	0.4139
8	0.3016	0.1779	0.3257
rerata	0.4197	0.19785	0.826325

Oneway GSH Sel Eritrosit Kelompok Kontrol, P1 dan P2

Descriptives

GSH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
GSH Kontrol	8	.4197	.33869	.11974	.1366	.7028	.09	1.05
GSH P1	8	.1979	.05816	.02056	.1492	.2465	.14	.32
GSH P2	8	.8263	.69318	.24508	.2468	1.4058	.28	2.34
Total	24	.4813	.50284	.10264	.2690	.6936	.09	2.34

Test of Homogeneity of Variances

GSH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.044	2	21	.016

ANOVA

GSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.625	2	.813	4.073	.032
Within Groups	4.190	21	.200		
Total	5.816	23			

T-Test GSH antar Kelompok Kontrol dengan P1

Group Statistics

KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GSH Kontrol	8	.4197	.33869	.11974
P1	8	.1979	.05816	.02056

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
GSH	Equal variances assumed	10.277	.006	1.826	14	.089	.2219	.12150	-.03873	.48243
	Equal variances not assumed			1.826	7.412	.108	.2219	.12150	-.06223	.50593

T-Test antara Kelompok Kontrol dengan P2

Group Statistics

KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GSH Kontrol	8	.4197	.33869	.11974
P2	8	.8263	.69318	.24508

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
GSH	Equal variances assumed	1.775	.204	-1.491	14	.158	-.4066	.27277	-.99165	.17840
	Equal variances not assumed			-1.491	10.162	.166	-.4066	.27277	-1.01308	.19983

T-Test antara Kelompok P1 dengan P2

Group Statistics

KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GSH P1	8	.1979	.05816	.02056
P2	8	.8263	.69318	.24508

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
GSH	Equal variances assumed	7.913	.014	-2.555	14	.023	-.6285	.24594	-1.15596	-.10099
	Equal variances not assumed			-2.555	7.099	.037	-.6285	.24594	-1.20839	-.04856

Parasitemia

Tabel 9.7. Tingkat parasitemia sebelum pemberian provitamin B5 (D0) dan setelah pemberian provitamin B5 (D4)

Waktu pengukuran	Replikasi	Parasitemia kelompok dosis (%)		
		Kontrol	P1	P2
D0	1	1	1	2,6
	2	1	3,2	5
	3	1,7	1,5	2,7
	4	2,3	2,3	4,6
	5	2,6	3,1	3,4
	6	2	3,1	1,8
	7	2,7	4,2	3,4
	8	2,2	1,2	2,4
D4	1	23	5	20,2
	2	16	6,4	23
	3	20	11,8	17,1
	4	12	8,1	10,2
	5	18,6	9,3	12,5
	6	19	10,8	18,7
	7	17	8,6	23,3
	8	16,7	7,7	23,1

Tabel 9.8. Pertumbuhan parasit dan hambatan pertumbuhan parasit pada pemberian provitamin B5

Replikasi	Pertumbuhan (%)			Hambatan pertumbuhan (%)		
	K	P1	P2	K	P1	P2
1	22	4	17,6	-38,8	74,7	-11
2	15	3,2	18	5,4	79,8	-13,6
3	18,3	10,3	14,4	-15,5	35	9
4	9,7	5,8	5,6	38,8	63	64,7
5	16	6,2	9,1	-0,9	60,9	42,6
6	17	7,7	16,9	-7,2	51	-6,6
7	14,3	4,4	19,9	9,7	72	-25,5
8	14,5	6,5	20,7	8,5	58,9	-30,6

Oneway Parasitemia Kelompok Kontrol,P1 dan P2

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Parasitemia sbl provit B5	Kontrol	8	1.9375	.65887	.23295	1.3867	2.4883	1.00	2.70
	P1	8	2.4500	1.13767	.40223	1.4989	3.4011	1.00	4.20
	P2	8	3.2375	1.10057	.38911	2.3174	4.1576	1.80	5.00
	Total	24	2.5417	1.09223	.22295	2.0805	3.0029	1.00	5.00
Parasitemia sth provit B5	Kontrol	8	17.7800	3.22200	1.13915	15.0863	20.4737	12.00	23.00
	P1	8	8.4625	2.21291	.78238	6.6125	10.3125	5.00	11.80
	P2	8	18.5225	4.98780	1.76345	14.3526	22.6924	10.22	23.28
	Total	24	14.9217	5.83822	1.19172	12.4564	17.3869	5.00	23.28
PERTUMBH	Kontrol	8	15.8500	3.54441	1.25314	12.8868	18.8132	9.70	22.00
	P1	8	6.0125	2.27121	.80299	4.1137	7.9113	3.20	10.30
	P2	8	15.2750	5.32910	1.88412	10.8198	19.7302	5.60	20.70
	Total	24	12.3792	5.93655	1.21179	9.8724	14.8860	3.20	22.00
INHIB	Kontrol	8	.0000	22.35838	7.90488	-18.6921	18.6921	-38.80	38.80
	P1	8	61.9125	14.34219	5.07073	49.9221	73.9029	35.00	79.80
	P2	8	3.6250	33.62154	11.88701	-24.4833	31.7333	-30.60	64.70
	Total	24	21.8458	37.39835	7.63391	6.0539	37.6378	-38.80	79.80

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Parasitemia sbl provit B5	1.609	2	21	.224
Parasitemia sth provit B5	2.501	2	21	.106
PERTUMBH	2.482	2	21	.108
INHIB	2.471	2	21	.109

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Parasitemia sbl provit B5	Between Groups	6.861	2	3.430	3.501	.049
	Within Groups	20.578	21	.980		
	Total	27.438	23			
Parasitemia sth provit B5	Between Groups	502.855	2	251.428	18.784	.000
	Within Groups	281.094	21	13.385		
	Total	783.950	23			
PERTUMBH	Between Groups	487.736	2	243.868	15.863	.000
	Within Groups	322.844	21	15.374		
	Total	810.580	23			
INHIB	Between Groups	19316.616	2	9658.308	15.782	.000
	Within Groups	12852.024	21	612.001		
	Total	32168.640	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Parasitemia sbl provit B5	Kontrol	P1	-.5125	.49494	.312	-1.5418	.5168
		P2	-1.3000*	.49494	.016	-2.3293	-.2707
	P1	Kontrol	.5125	.49494	.312	-.5168	1.5418
		P2	-.7875	.49494	.127	-1.8168	.2418
	P2	Kontrol	1.3000*	.49494	.016	.2707	2.3293
		P1	.7875	.49494	.127	-.2418	1.8168
Parasitemia sth provit B5	Kontrol	P1	9.3175*	1.82931	.000	5.5132	13.1218
		P2	-.7425	1.82931	.689	-4.5468	3.0618
	P1	Kontrol	-9.3175*	1.82931	.000	-13.1218	-5.5132
		P2	-10.0600*	1.82931	.000	-13.8643	-6.2557
	P2	Kontrol	.7425	1.82931	.689	-3.0618	4.5468
		P1	10.0600*	1.82931	.000	6.2557	13.8643
PERTUMBH	Kontrol	P1	9.8375*	1.96045	.000	5.7605	13.9145
		P2	.5750	1.96045	.772	-3.5020	4.6520
	P1	Kontrol	-9.8375*	1.96045	.000	-13.9145	-5.7605
		P2	-9.2625*	1.96045	.000	-13.3395	-5.1855
	P2	Kontrol	-.5750	1.96045	.772	-4.6520	3.5020
		P1	9.2625*	1.96045	.000	5.1855	13.3395
INHIB	Kontrol	P1	-61.9125*	12.36933	.000	-87.6359	-36.1891
		P2	-3.6250	12.36933	.772	-29.3484	22.0984
	P1	Kontrol	61.9125*	12.36933	.000	36.1891	87.6359
		P2	58.2875*	12.36933	.000	32.5641	84.0109
	P2	Kontrol	3.6250	12.36933	.772	-22.0984	29.3484
		P1	-58.2875*	12.36933	.000	-84.0109	-32.5641

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 9

Jadual Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan	Waktu (Bulan) Tahun 2006									
		Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Agt	Spt	Okt	Nop	Des
1.	Penelusuran kepustakaan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.	Penyusunan proposal	x	x	x	x	x					
3.	Konsultasi dan koreksi proposal					x	x				
4.	Ujian proposal					x					
5.	Persiapan penelitian					x	x	x	x		
6.	Pelaksanaan penelitian		x	x			x	x	x		
7.	Pembahasan hasil dan konsultasi						x	x	x	x	
8.	Ujian tesis									x	
9.	Perbaikan dan penyerahan tesis									x	x