

T E S I S

W
TVC 2015
P
J

**EFEK ANTIPLASMODIAL EKSTRAK BIJI
PARE (*Momordica charantia L*) PADA
MENCIT (*Mus Musculus*) YANG
DIINFEKSI DENGAN
*Plasmodium berghei***



**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**MARIHOT PASARIBU, dr
090214731M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

T E S I S

**EFEK ANTIPLASMODIAL EKSTRAK BIJI
PARE (*Momordica charantia L*) PADA
MENCIT (*Mus Musculus*) YANG
DIINFEKSI DENGAN
*Plasmodium berghei***

**MARIHOT PASARIBU, dr
090214731M**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**EFEK ANTIPLASMODIAL EKSTRAK BIJI
PARE (*Momordica charantia L*) PADA
MENCIT (*Mus Musculus*) YANG
DIINFEKSI DENGAN
*Plasmodium berghei***

T E S I S

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

MARIHOT PASARIBU, dr
090214731M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 29 Maret 2005

iii

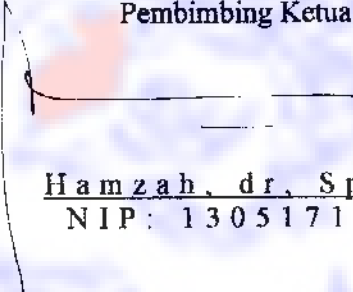
Efek Antiplasmodial Ekstrak Biji
Pare (*Momordica Charantia L*) Pada
Mencit (*Mus Musculus*) Yang . . .

Lembar pengesahan


TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL,

Oleh

Pembimbing Ketua


Hamzah, dr, SpFK
NIP: 130517164

Pembimbing


Sri Agus Suiarwo, drh, PhD
NIP: 130729865

Telah diuji pada
Tanggal 29 Maret 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Moch. Soedjak N., dr, SpFK

Anggota :
1. Hamzah, dr, SpFK
2. Sri Agus Sudjarwo, drh, PhD
3. Kusmartisnawati, dr, M.S.,SpPar(K)
4. Andjar Sardjimah, dra, Apt., M.S.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucap puji dan syukur yang tiada terkira kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan berkat dan kasihnya kepada saya sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada dr.Hamzah, SpFK, Pembimbing Ketua yang telah berkenan menerima saya dengan segala kekurangan saya sebagai bimbingan beliau dan dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada drh. Sri Agus Sudjarwo, Phd, Pembimbing yang telah penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, dorongan, dan saran.

Pada kesempatan ini saya juga mengucapkan terimakasih kepada :
Pemerintah Republik Indonesia cq Pemerintah Daerah Tingkat I Kalimantan Timur yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan Program Magister.

Rektor universitas Airlangga Prof.Dr.Med. Puruhito dr, SpBTKV yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Prof.Dr.H.Muhammad Amin dr, DTM & H beserta seluruh staf pimpinan Program Pascasarjana atas kesempatan yang diberikan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Magister Prof. Retnohandayani dr.MS, PhD atas kesempatan yang diberikan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister.

Penanggung Jawab Mata Kuliah Ilmu Farmakologi Dr. Endang Isbandianti dr MS., SpFK dan mantan PJMK dr Rahardjo SpFK atas kesempatan yang diberikan kepada saya menjadi mahasiswa program magister.

Para dosen dan penguji pada Program Magister : dr Hamzah SpFK, drh Sri Agus Sudjarwo, PhD., dr Moch. Soedjak N., SpFK., dr Kusmartisnawati, M.S., SpPar(K) dan dra Andjar Sardjimah, Apt.,M.S.

Rektor Universitas Mulawarman Prof. Ir. H.Racmad Hernadi, M.Sc atas kesempatan yang diberikan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister .

Ketua Program Pendidikan Dokter Universitas Mulawarman dr Emil B. Moerad, SpP yang memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti program magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepala Lab Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair yang telah memberi izin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Bahan Alam.

Pembimbing penelitian di Lab Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair Dra. Aty Widyawaruyanti, MSi atas bimbingan dan bantuan yang diberikan.

Teman seangkatan di Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Peminatan Farmakologi Angkatan 2002/2003 : drh Samsuri dan dr Lestari Dewi.

Sahabat terbaikku dr Epi br Panjaitan atas segala dorongan, motivasi dan kritiknya, semoga Tuhan merestui rencana-rencana kita.

Kepada teman-teman di Pasca Sarjana Unair : Bu Is, Ike, Ifa dll

Kepada dra Maria, MSi di program doktor ilmu farmasi dan teman-teman di program magister farmasi : drs Nur, drs Arief dan drs Maks untuk diskusi dan bantuan yang diberikan.

Adik-adik mahasiswa di Fakultas Farmasi : Lendy Nugroho, Erna, Yusni, Ade, Rapika dll untuk bantuan yang telah diberikan.

Kepada Pak Supardi dan Pak Kadi di bagian Lab Hewan Fakultas Farmasi Unair. Teman-teman kost di Karmen IV/2 : dr Tjokorda MS, SpPK (Ajung), dr Devi, dr Indra SpTHT, dr Maksum, dr Edwin, dr Erwin dan Wawan untuk kebersamaan, dukungan dan bantuan yang diberikan.

Penghormatan saya yang setinggi-tingginya dan terimakasihku yang tiada terhingga kepada Almarhum Bapakku : St. S. Pasaribu dan Almarhumah Ibuku : E.br Simatupang, semoga Tuhan Kita Sang Penyelamat memberikan tempat yang mulia disisiNya.

Terimakasihku kepada saudara-saudaraku : dra M.Pasaribu dan keluarga, drs H.Pasaribu dan keluarga, H br Pasaribu SH dan keluarga dan Bripka A.Pasaribu.

Orang-orang yang telah membantu saya yang tidak disebut satu persatu, terimakasih atas bantuan yang telah diberikan.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan memberikan balasan yang jauh lebih baik kepada saudara. Amin.

RINGKASAN

EFEK ANTIPLASMODIAL EKSTRAK BIJI PARE (*Momordica charantia L.*)
TERHADAP MENCIT (*Mus Musculus galur BALB/C*) YANG DIINFEKSI
DENGAN *Plasmodium berghei* galur ANKA

MARIHOT PASARIBU, dr

Malaria masih merupakan penyakit parasit yang paling berbahaya didunia sampai saat ini. Setelah ditemukannya khasiat insektisida dari DDT dalam tahun 1936-1939 (Muller dan Wresman) dikembangkan pembasmian atau eradikasi malaria dalam tahun 1955-1939. Namun usaha tersebut hanya berhasil disebagian dunia. Malaria tetap menjadi masalah kesehatan utama di dunia. Hal ini disebabkan terjadinya resistensi plasmodium terhadap obat yang ada dan meningkatnya kekebalan vektor nyamuk (*Anopheles*) terhadap insektisida.

Penyebaran *plasmodium* yang resisten terhadap obat antimalaria dan timbulnya efek samping yang berat, mendesak untuk penemuan antimalaria yang baru, yang ditoleransi lebih baik dan lebih efisien. Penelitian ini sangat diperlukan mengingat resistensi yang terjadi berkembang dengan cepat. Kebutuhan akan obat malaria baru ini mendorong penelitian-penelitian tentang obat malaria yang berasal dari bahan alam khususnya tumbuh-tumbuhan. Bahan alam ini merupakan sumber penting dari berbagai bahan aktif biologik yang potensial dikembangkan sebagai obat antimalaria baru. Pada umumnya bahan aktif biologik dari alam ini lebih aman terhadap mammalia, termasuk manusia.

Momordica charantia L. atau yang dikenal sebagai Pare merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria. Banyak golongan senyawa dari tumbuhan yang bersifat antimalaria, tetapi beberapa senyawa yang penting dan mempunyai biopotensi antimalaria antara lain: alkaloid, lakton, terpenoid, xanton dan flavonoid. Kandungan senyawa yang terdapat dalam biji *Momordica charantia L.* antara lain resin, triterpen, proteid, lipid, steroid, karbohidrat, alkaloid, glikosida saponin tipe *cucurbitacin*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari ekstrak air biji *Momordica charantia L.* dan pengaruhnya terhadap pembentukan hematin secara *in vivo* pada mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *The Posttest-Control Group Design* (pengambilan data dilakukan setelah perlakuan) dan dibandingkan dengan kontrol. Pada penelitian ini digunakan 6 (enam) kelompok hewan coba dan masing-masing 1 (satu) kelompok kontrol negatif dan positif. Setiap kelompok masing-masing dengan 3 (tiga) replikasi. Ekstrak biji pare yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam dosis 1000; 100; 10; 1; 0,1 dan 0,01 mg/kgbb mencit yang diberikan secara oral dengan sonde dimulai pada hari ke-3 setelah inokulasi *Plasmodium berghei* (dianggap sebagai hari ke-1 perlakuan = H₁) pada mencit yang sehat.

Penghitungan parasitemia dilakukan setiap hari sebelum diberi perlakuan. Jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dihitung tiap 1000 eritrosit dengan mikroskop perbesaran 1000 kali. Kadar hematin didapatkan melalui perbandingan antara alkalin hematin dengan oxyhemoglobin secara spektroskopik dengan kuvet 0,5 cm pada panjang gelombang berikut: 540, 576, 593 nm.

Data kemudian diolah dengan *SPSS 11.5 for Windows* dengan Analisis Sidik Ragam (*ANOVA*) dengan tingkat kepercayaan 5% ($\alpha = 0,05$). Apabila hasil antar perlakuan berbeda nyata, dengan hasil $F_h > F_t$ maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Signifikan Difference*) untuk melihat perlakuan yang paling bermakna.

Uji statistika rerata penghambatan pertumbuhan parasit antar kelompok perlakuan berbeda bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,59$). Rerata penghambatan pertumbuhan parasit tertinggi antar kelompok dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L.* ($N=3$; $Mean = 46,5$; $SD = 1,71$; $SE = 0,99$). Rerata penghambatan pertumbuhan parasit antara kelompok perlakuan dengan kontrol berbeda bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,35$). Uji statistika rerata kadar hematin antar kelompok perlakuan tidak berbeda (*Uji Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 12,44$). Rerata kadar hematin antara kelompok perlakuan dengan kontrol tidak berbeda (*Uji Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 11,7$).

S U M M A R Y

ANTIPLASMODIAL EFFECT OF AQUAEUS EXTRACT OF PARE (*Momordica charantia L*) SEEDS IN *Plasmodium berghei* STRAIN ANKA – INFECTED MICE (*Mus musculus* STRAIN BALB/C)

MARIHOT PASARIBU, dr

Malaria is the most important parasitic disease in the world. In Indonesia, malaria represent one of the contagion influencing baby mortality, mother and child bear and also can degrade productivity. After finding of insecticides of DDT in year 1936-1939 (Muller and of Wresman) developed eradication of malaria in year 1955-1939. But the effort only succeeding in this part of world. Malaria still remain to be the especially problem of health in the world. This matter is caused by the resistance of plasmodium to existing drug and the increasing of impenetrability of mosquito vector (*Anopheles*) to insecticide.

Spreading of plasmodium which is resistant to drug of antimalarial and incidence of heavy side effects, insisting on for the invention of new antimalarial, which is better tolerance and more efficient. This Research very needed to remember resistance that happened expand swiftly. Requirement this new malaria push researches about malaria drug coming from natural materials specially flora. This Natural materials represent important source from various active materials of biologics which is potential to be developed as drug of new antimalarials. In general, the active biologics materials more peaceful to mammalia, including human.

Momordica charantia L. (Pare) represent one of the used crop traditionally as drug of antimalarial. Many compound faction of plant having the character of antimalarial, but some important compound and have antimalarial biopotence are: alkaloid, lactone, terpenoids, xantone and flavonoid. The compound which there are in seed of *Momordica charantia L.* are: resin, triterpene, proteid, lipid, steroid, carbohydrate, alkaloid, saponin glycosides of cucurbitacin type.

This research aim to investigate the antimalarial activity of aqueous extract of *Momordica charantia L* seeds and its influence to perform of hematin in *Plasmodium berghei*-infected mice *in vivo*. This research represent *The Posttest-Control Group Design* (the data conducted after treatment) and compared to control. Groups of six mice were used to assay the different concentration of seeds extracts, two control groups were also included; positive and negative controls, with 3 replication. Oral treatment was started on day 3 post infection (as H₁ treatment) with aqueous extracts dissolved in CMCNa 0,5%, at a dose of 1000; 100; 10; 1; 0,1 and 0.01 mg/kg of body weight and was then continued daily for 4 days (H₂, H₃, H₄). 24 hours after the last treatment, the blood was intake by intra cardial puncture for the inspection of rate of hematin.

The parasitemia of each treatment was determined by microscopic examination of thin blood smears stained with 10% *Giemsa's* stain before the next treatment. The total number of RBCs infected are counted in 1000 RBCs with 1000 microscope magnification. Rate of hematin got through by comparison the hematin alkaline with oxyhemoglobin spectrophotometrically in 0.5 cm lights path cuvette at the following wavelength: 540, 576, 593 nm.

Data is analyzed with *SPSS 11,5 for Windows* with Analysis of Variance (ANOVA) with $\alpha = 5\%$. If the result of between treatment differ significantly, where the $F_h > F_t$ hence continued with the LSD (Least Signifikan Difference) test to see the most having a different mean of the treatment.

The results between groups showed a significant reduction in parasitemias (*Test of Anova*, $p < 0,05$; *Test LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,59$). The highest parasite reduction at group of treatment showed at dose 10 mg/kg body weight ($N=3$; $Mean = 46,5$; $SD = 1,71$; $SE = 0,99$). All treated groups showed a significant reduction in parasitemias compared to those for the control group (*Test of Anova*, $p < 0,05$; *Test LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,35$). The rate of hematin between group of treatment not significantly different (*Test of Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 12,44$). All treated groups not showed a significant rate of hematin compared to those for the control group (*Test of Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 11,7$).

A B S T R A C T

ANTIPLASMODIAL EFFECT OF AQUAEUS EXTRACT OF PARE (*Momordica charantia L*) SEEDS IN *Plasmodium berghei* STRAIN ANKA – INFECTED MICE (*Mus musculus* STRAIN BALB/C)

MARIHOT PASARIBU, dr

The aim of this research was to investigate the antimalarial activity of the aqueous extract of *Momordica charantia L* seed and its influence to perform the hematin in *Plasmodium berghei*-infected mice in vivo. Groups of six mice were used to assay the different concentration of seeds extracts, two control groups were also included; positive and negative controls, with 3 replication.

Oral treatment was started on day 3 post infection (as H₁ treatment) with aqueous extracts dissolved in CMCNa 0,5%, at a dose of 1000; 100; 10; 1; 0,1 and 0.01 mg/kg of body weight and was then continued daily for 4 days (H₂, H₃, H₄). 24 hours after the last treatment, the blood was intake by intra cardial puncture for the inspection of rate of hematin.

The parasitemia of each treatment was determined by microscopic examination of thin blood smears stained with 10% Giemsa's stain, the total number of RBCs infected are counted in 1000 RBCs with 1000 microscope magnification. Rate of hematin got through by comparison between hematin alkaline with oxyhemoglobin sphectrophotometrically in 0.5 lights path cuvette at the following wavelength: 540, 576, 593 nm.

The results between groups showed a significant reduction in parasitemias (*Test of Anova*, $p < 0,05$; *Test LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,59$). The highest parasite reduction at group of treatment showed at dose 10 mg/kg body weight ($N=3$; $Mean = 46,5$; $SD = 1,71$; $SE = 0,99$). All treated groups showed a significant reduction in parasitemias compared to the control group (*Test of Anova*, $p < 0,05$; *Test LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,35$). The rate of hematin between group of treatment not signifantly different (*Test of Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 12,44$). All treated groups not showed a significant rate of hematin compared to the control group (*Test of Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 11,7$).

Keywords : Pare, *Momordica charantia* Linn., seed, antimalaria, *Plasmodium berghei*, oxyhemoglobin, alkaline hematine, hematine.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	viii
Summary	x
Abstract	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Pare (<i>Momordica charantia</i> L.)	7
2.1.1 Klasifikasi	7
2.1.2 Distribusi geografis	8
2.1.3 Morfologi Pare (<i>Momordica charantia</i> L.)	8
2.1.4 Kegunaan secara empirik	9
2.1.5 Senyawa kimiawi dan efek terapi	9
2.2 Tinjauan Tentang Parasit <i>Plasmodium berghei</i>	12
2.2.1 Klasifikasi <i>Plasmodium berghei</i>	12
2.2.2 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	13
2.2.3 Siklus hidup <i>Plasmodium berghei</i>	15
2.2.4 <i>Plasmodium berghei</i> sebagai model untuk riset malaria	16
2.3 Malaria dan Patogenesisnya	18
2.3.1 Malaria	18
2.3.2 Patogenese malaria	19
2.4 Klasifikasi Obat antimalaria	20
2.5 Usaha-Usaha Penemuan Obat Antimalaria	21
2.5.1 <i>Optimize therapy with existing agent</i>	22
2.5.2 <i>Development of analogs of existing agent</i>	22
2.5.3 <i>Natural products</i>	23
2.5.4 <i>Compounds active againts other diseases</i>	23
2.5.5 <i>Drug resistance reversers</i>	25
2.5.6 <i>Compounds active against new target</i>	25
2.6 Protease dan Rupturnya Eritrosit	26
2.7 Katabolisme Hemoglobin dan Detoksifikasi Haem	26

	didalam Plasmodium	27
2.8	Hematin.....	30
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	33
3.1	Kerangka Konseptual	33
3.2	Hipotesis	36
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN	36
4.1	Rancangan Penelitian	38
4.2	Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	39
4.3	Variabel Penelitian	42
4.3.1	Klasifikasi variabel.....	42
4.3.2	Defenisi operasional variabel	42
4.4	Bahan-Bahan Penelitian	43
4.4.1	Bahan tanaman	43
4.4.2	<i>Plasmodium berghei</i>	44
4.4.3	Bahan untuk pemeriksaan parasitemia	44
4.4.4	Bahan untuk pemeriksaan Alkalin hematin dan Oxyhemoglobin	44
4.4.5	Bahan pelarut	44
4.4.6	Bahan habis pakai	44
4.5	Instrumen Penelitian	44
4.5.1	Alat untuk ekstraksi	44
4.5.2	Alat untuk pemeriksaan parasitemia	44
4.5.3	Alat untuk pemeriksaaan panjang gelombang Alkalin hematin dan Oxyhemoglobin	44
4.6	Persiapan Penelitian	45
4.6.1	Pembuatan ekstrak uji	45
4.6.2	Persiapan hewan coba	45
4.6.3	Inokulasi Plasmodium berghei	45
4.7	Tahap Pelaksanaan	46
4.7.1	Pemberian perlakuan	46
4.7.2	Pemeriksaan parasitemia	46
4.7.3	Uji hambatan pertumbuhan <i>Plasmodium berghei</i> yang diberi ekstrak air biji Pare (<i>Momordica charantia L.</i>).....	47
4.7.4	Penentuan kadar hematin.....	48
4.8	Pengolahan dan Analisa Data	49
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	50
5.1	Efek ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) terhadap kadar parasitemia mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i>	50
5.2	Efek ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) terhadap kadar hematin mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i>	56
5.3	Uji Probit aktivitas antimalaria ekstrak air biji <i>M charantia L.</i> terhadap mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i>	58
BAB 6	PEMBAHASAN	59
BAB 7	PENUTUP	67
7.1	Kesimpulan	67
7.2	Saran	67
	DAFTAR PUSTAKA	68
	LAMPIRAN	73

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Perbedaan antara malaria rodensia dengan manusia	13
Tabel 2.2 : Usaha-usaha penemuan dan pengembangan antimalaria	23
Tabel 2.3 : Kandungan obat antimalaria yang aktif terhadap target lama dan baru	26
Tabel 4.1 : Rancangan pelaksanaan	39
Tabel 5.1 : Rata-rata persen parasitemia dari mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i> yang diberi ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) dan kontrol	50
Tabel 5.2 : Rata-rata penghambatan pertumbuhan parasit dari mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i> yang diberi ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) dan kontrol	54
Tabel 5.3 : Rata-rata kadar hematin yang terbentuk pada darah mencit yang diinfeksi dengan <i>Plasmodium berghei</i> dan mendapat perlakuan ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) dan kontrol.....	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Pare (<i>Momordica charantia L.</i>)	7
Gambar 2.2 : Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	14
Gambar 2.3 : Siklus hidup <i>Plasmodium spp</i>	21
Gambar 2.4 : Gambar organella tropozoit <i>Plasmodium</i>	24
Gambar 2.5 : Skema target protease pada daur hidup malaria fase eritrosit	28
Gambar 2.6 : Gambar eritrosit yang mengandung parasit	30
Gambar 2.7 : Struktur molekul haemozoin	31
Gambar 3.1 : Bagan kerangka konseptual	37
Gambar 4.1 : Rancangan percobaan	38
Gambar 4.2 : Bagan alur penelitian	41
Gambar 5.1 : Efek ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) terhadap persentasi parasitemia mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i>	51
Gambar 5.2 : Efek ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) terhadap penghambatan pertumbuhan parasit terhadap mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i>	55
Gambar 5.3 : Efek ekstrak air biji pare (<i>Momordica charantia L.</i>) terhadap kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan <i>P berghei</i>	57

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Uraian tentang jadwal kegiatan	73
Lampiran 2 : Biaya satuan penelitian	74
Lampiran 3 : Gambar Buah dan Biji Pare (<i>Momordica charantia L.</i>).....	75
Lampiran 4 : Gambar hapusan darah tipis mencit yang diinfeksi dengan <i>Plasmodium berghei</i> dan mendapat perlakuan dengan ekstrak air Biji Pare (<i>Momordica charantia L.</i>)	75
Lampiran 5 : Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji	76
Lampiran 6 : Volume Suspensi Ekstrak Uji Yang di Sondakan	77
Lampiran 7 : Penghitungan Persen Parasitemia	77
Lampiran 8 : Penghitungan Pertumbuhan Parasit	78
Lampiran 9 : Penghitungan Aktivitas Antimalaria Ekstrak Uji	79
Lampiran 10 : Penghitungan Absorbansi Darah Hewan Coba	80
Lampiran 11 : Penghitungan Kadar Hematin.....	81
Lampiran 12 : Kadar Parasitemia dari Mencit yang Diberi Ekstrak Air Biji Pare dan Kontrol	82
Lampiran 13 : Rekapitulasi Data Absorbansi Darah Hewan Coba.....	83
Lampiran 14 : <i>Compare Means</i> Pertumbuhan Parasit.....	84
Lampiran 15 : <i>Compare Means</i> Penghambatan Pertumbuhan Parasit.....	86
Lampiran 16 : <i>Compare Means</i> Rasio Absorbansi Sampel Darah.....	88
Lampiran 17 : <i>Compare Means</i> Kadar Hematin.....	90
Lampiran 18 : Probit Ekstrak Air <i>Momordica charantia</i> LINN.....	92

DAFTAR SINGKATAN

GTP	=	Guanidine triphosphate
pABA	=	para-Amino Benzoic Acid.
DHF	=	Dihydrofolate.
ED ₅₀	=	Effective Dose 50
THF	=	Tetrahydrofolate.
dUMP	=	Deoxy uridine monophosphate.
dTMP	=	Deoxy thymidine monophosphate.
IPP	=	Isopentenyl pyrophosphate.
FPIX2+ and FPIX3+	=	Ferro and ferric protoporphyrin IX.
CMCNa 0,5%	=	Carboxymethylcellulose Sodium 0.5%.
PR	=	Parasite Rate
		PR adalah persentase penduduk yang darahnya mengandung parasit malaria pada saat tertentu. Kelompok umur yang dicakup biasanya adalah golongan 2-9 tahun dan 0-1 tahun. PR kelompok 0-1 tahun mengandung arti khusus dan disebut infant rate (IPR) dan dianggap sebagai indeks transmisi karena menunjukkan adanya transmisi lokal.
AMI	=	Annual Malaria Incidence
		AMI adalah kasus malaria yang dikonfirmasi dalam 1 tahun dibagi jumlah penduduk daerah tersebut dikali dengan 1000.
SPR	=	Slide Positivity Rate
		SPR adalah persentase sediaan darah yang positif malaria.

BAB I
PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh protozoa obligat intraselluler dari genus *Plasmodium*, dan merupakan penyakit infeksi karena parasit yang paling berbahaya. Angka morbiditas dan mortalitas karena penyakit ini masih cukup tinggi. Penyebaran penyakit ini sangat luas yang meliputi lebih dari 100 negara yang beriklim tropis dan subtropis. Penduduk yang beresiko terkena malaria berjumlah sekitar 2,4 miliar atau 40% dari penduduk dunia. Setiap tahun jumlah kasus malaria berjumlah sekitar 300-500 juta dan mengakibatkan 1,5 s/d 2,7 juta kematian terutama di Afrika Sub-Sahara (WHO, 2000. Gunawan, 2000). Di Indonesia, malaria merupakan salah satu penyakit menular yang mempengaruhi angka kematian bayi, anak dan ibu melahirkan serta dapat menurunkan produktivitas tenaga kerja. Angka kesakitan penyakit ini masih cukup tinggi terutama di Kawasan Indonesia Timur. Kejadian Luar Biasa malaria masih terjadi terutama di daerah yang terjadi perubahan lingkungan, misalnya tambak udang atau ikan yang tidak terpelihara, penebangan pohon bakau, muara sungai yang tersumbat yang akan menjadi tempat perindukan nyamuk malaria. Hasil survei malariometrik melalui daerah prioritas diluar Jawa-Bali sejak tahun 1989 s/d 1997 menghasilkan *Parasite Rate* (PR) sekitar 4-5 %. Beberapa Kejadian Luar Biasa malaria yang telah terjadi pada tahun 1997 ialah di P. Bintang, Aceh (transmigran), UPT Armopa Irian Jaya (transmigrasi) dan Kabupaten Jaya Wijaya, Irian Jaya (daerah pegunungan yang terkena kekeringan). Di Kalimantan Timur,

pada tahun 1997 dijumpai 17.864 kasus malaria dengan *Annual Malaria Incidence* (AMI) = 7,03% dan *Slide Positivity Rate* (SPR) = 35,11% (Laihad, 2000).

Kekebalan plasmodium terhadap klorokuin dijumpai tahun 1960 di Kolombia dan Venezuela, tak lama kemudian menyusul Thailand dan Kamboja. Malaria yang resisten terhadap klorokuin dijumpai hampir di lebih 40 negara. Selain resistensi terhadap klorokuin, sebagai *drug of choice*, resistensi terhadap obat lain seperti meflokuin dan golongan lain sudah dijumpai dan secara laboratorik parasit malaria juga sudah resisten terhadap artemisin. Selain penyebaran resistensi parasit, masalah yang lebih serius adalah efek samping dari obat antimalaria seperti terjadinya *toxic epiderm necrosis* oleh *pyrimethamine-sulphadoxine* (Phillipson, 1991).

Penyebaran *plasmodium* yang resisten terhadap obat antimalaria dan timbulnya efek samping yang berat, mendesak untuk penemuan antimalaria yang baru, yang ditoleransi lebih baik dan lebih efisien. Kebutuhan akan obat malaria baru ini mendorong penelitian-penelitian tentang obat malaria yang berasal dari bahan alam khususnya tumbuh-tumbuhan. Bahan alam ini merupakan sumber penting dari berbagai bahan aktif biologik yang potensial dikembangkan sebagai obat antimalaria baru. Pada umumnya bahan aktif biologik dari alam ini lebih aman terhadap mamalia, termasuk manusia. Ketertarikan terhadap bahan alam sebagai sumber antimalaria yang baru distimulasi oleh keberhasilan isolasi *artemisinin*, suatu kandungan aktif dari tumbuhan *Artemesia annua* (*qingho*), tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional Cina untuk penderita demam (Devi, 2000. Tjitra, 2000, WHO, 2000).

Momordica charantia L. atau yang dikenal sebagai Pare merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria, selain peluruh dahak, obat cacing dan anti diabetes (Hien, 1999. Syamsuhidayat, 1991). Dengan pendekatan etnofarmakologi *Momordica charantia L.* telah digunakan sebagai antimalaria dan mengobati demam di Brazil, Guatemala, Peru, India, Nikaragua, USA, Venezuela, Mexico, dan Indonesia. Bagian yang digunakan adalah akar, batang, daun, bunga dan buah (Hadi S, 2001. Köhler, 2002. Syamsuhidayat SS, 1991. Taylor L, 2002). Ueno, Doyama, dan Padovani E Salata (1996) di Brazil, meneliti efek antimalaria *in vivo* dari ekstrak etanol batang dan infusikan daun *Momordica charantia L.* terhadap mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan kedua ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antimalaria dengan dosis masing-masing 1 gr/kgbb (Taylor L, 2002). Percobaan secara *in vitro* aktivitas antimalaria dari ekstrak lipofilik batang dan daun *Momordica charantia L.* yang dilakukan oleh Köhler *et al* memperlihatkan efek antimalaria dengan IC_{50} 6-25 μ m/ml terhadap *Plasmodium falciparum* (Köhler, 2002). Bagian yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pare.

Banyak golongan senyawa dari tumbuhan yang bersifat antimalaria, tetapi beberapa senyawa yang penting dan mempunyai biopotensi antimalaria antara lain: alkaloid, laktou, terpenoid, xanton dan flavonoid (Saxena, 2003). Kandungan senyawa yang terdapat dalam biji *Momordica charantia L.* antara lain resin, triterpen, proteid, lipid, steroid, karbohidrat, alkaloid, glikosida saponin tipe *cucurbitacin* (Taylor L, 2002. Hien, 1999. Syamsuhidayat, 1991). Dari senyawa yang dikandung biji *Momordica charantia L.* tersebut ada beberapa senyawa yang berefek antimalaria yaitu triterpen dan alkaloid.

Selain penemuan obat antimalaria baru, penelitian juga dilakukan terhadap target kerja obat. Target kerja antimalaria golongan kuinolin seperti klorokuin, menjadi perhatian utama dalam mendisain obat baru (Egan, 2004). Data-data yang telah didapatkan dari penelitian sebelumnya menunjukkan indikasi kuat bahwa golongan kuinolin ini menghambat degradasi hemoglobin sebagai sumber hematin pada fase eritrosit malaria (Egan, 2004. Sukarban, 1995).

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka perlu dilakukan penelitian terhadap aktivitas antimalaria dari ekstrak biji *Momordica charantia L.* dan pengaruhnya terhadap pembentukan hematin secara *in vivo* pada mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

Selain masalah etika percobaan pada manusia, penelitian dengan menggunakan *Plasmodium falciparum* membutuhkan biaya yang banyak dan tingkat kesulitan yang tinggi. Adapun infeksi malaria pada penelitian ini menggunakan suatu model malaria yaitu *Plasmodium berghei*, suatu parasit malaria pada rodensia yang diinfeksi ke hewan coba mencit (*Mus musculus L.*). Parasit ini merupakan model yang praktis untuk studi eksperimental tentang malaria pada mamalia. Karena, menurut Dick dan Carter (1977), parasit ini terbukti merupakan analog dari malaria pada manusia dan primata lain dalam beberapa hal aspek esensial seperti struktur, fisiologi, dan siklus hidup (Janse, 2002. Noble dan Noble, 1989).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka dibuat rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia L*) menurunkan kadar parasitemia darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.
2. Apakah ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia L*) menghambat pertumbuhan plasmodium darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.
3. Apakah ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia L*) menurunkan kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk membuktikan efek antiplasmodial ekstrak biji Pare (*Momordica charantia*) terhadap pertumbuhan *plasmodium* secara *in-vivo*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Untuk membuktikan bahwa ekstrak air biji Pare (*M.charantia L*) menurunkan kadar parasitemia mencit yang diinfeksi dengan *P.berghei*.
2. Untuk membuktikan bahwa ekstrak air biji Pare (*M.charantia L*) menghambat pertumbuhan *plasmodium* pada mencit yang diinfeksi dengan *P.berghei*.
3. Untuk membuktikan bahwa ekstrak air biji Pare (*M.charantia L*) menurunkan kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan *P.berghei*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini berguna untuk mendapatkan informasi tentang efek ekstrak biji Pare (*Momordica charantia L*) terhadap *Plasmodium berghei*.
2. Hasil penelitian ini berguna untuk mendapatkan informasi tentang efek ekstrak biji Pare (*Momordica charantia L*) terhadap kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.
3. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai pedoman untuk penelitian selanjutnya dalam hal pengembangan obat-obat baru yang berasal dari tumbuhan.
4. Untuk merangsang minat para peneliti untuk lebih giat dalam penelitian tentang obat-obat dari bahan alam sebagai pemanfaatan keane-karagaman hayati alam Indonesia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pare (*Momordica charantia* L.)

2.1.1 Klasifikasi:

- Phylum* : *Spermatophyta*.
Subphylum: *Angiosperma*.
Class : *Dicotyledonae*.
Order : *Cucurbitales*.
Family : *Cucurbitaceae*.
Genus : *Momordica*.
Spesies : *Momordica charantia*.LINN.



Gambar 2.1.

Pare (*Momordica charantia* L.) :

1. Daun.
2. Bunga jantan pada potongan longitudinal.
3. Bunga betina pada potongan longitudinal.
4. Bunga jantan tanpa daun pada potongan tengah.
5. Buah pada penampang luar
(Hien, 1999)

Nama Lokal :

Indonesia: paria (general), paria, pare, pare palit, pepareh (Jawa).

(Syamsuhidayat, 1991).

2.1.2 Distribusi geografis.

Pare banyak terdapat di daerah tropika, tumbuh baik di dataran rendah dan dapat ditemukan tumbuh liar di tanah terlantar, tegalan, dibudidayakan atau ditanam di pekarangan dengan dirambatkan di pagar, untuk diambil buahnya. Tanaman ini tidak memerlukan banyak sinar matahari, sehingga dapat tumbuh subur di tempat-tempat yang agak terlindung. Tanaman setahun, merambat atau memanjat dengan alat pembelit atau sulur berbentuk spiral, banyak bercabang, berbau tidak enak (Hien, 1999. Anonim, 2004).

2.1.3 Morfologi Pare (*Momordica charantia L.*)

Batang berasuk lima, panjang 2-5 m, yang muda berambut rapat. Daun tunggal, bertangkai yang panjangnya 1.5-5.3 cm, letak berseling, bentuknya bulat panjang, dengan panjang 3.5-8.5 cm, lebar 4 cm, berbagi menjari 5-7, pangkal berbentuk jantung, warnanya hijau tua. Taju bergigi kasar sampai berlekuk menyirip. Bunga tunggal, berkelamin dua dalam satu pohon, bertangkai panjang, berwarna kuning. Buah bulat memanjang, dengan 8-10 rusuk memanjang, berbintil-bintil tidak beraturan, panjangnya 8-30 cm, rasanya pahit. Warna buah hijau, bila masak menjadi oranye yang pecah dengan 3 katup. Biji banyak, coklat kekuningan, bentuknya pipih memanjang, keras. Ada 3 jenis tanaman pare, yaitu pare gajah, pare kodok dan pare hutan. Pare gajah berdaging tebal, warnanya hijau muda atau keputihan, bentuknya besar dan panjang dan rasanya tidak begitu pahit. Pare kodok buahnya bulat pendek, rasanya pahit. Pare hutan adalah pare yang tumbuh liar, buahnya kecil-kecil dan rasanya pahit. Untuk memperoleh buah yang panjang dan lurus, biasanya pada ujung buah yang masih kecil digantungkan batu.

Daun dari pare yang tumbuh liar, dinamakan daun tundung. Daun ini dikatakan lebih berkhasiat bila digunakan untuk pengobatan. Daun dan buahnya yang masih muda dimakan sebagai lalab mentah atau setelah dikukus terlebih dahulu, dimasak sebagai sayuran, tumis, sambal goreng, gado-gado, dan sebagainya. Tanaman ini juga dapat digunakan untuk membunuh serangga. Perbanyakkan dengan biji (Hien, 1999).

2.1.4 Kegunaan secara empirik

Buah digunakan sebagai obat tradisional untuk pengobatan: batuk, radang tenggorok (pharyngitis), haus karena panas dalam, mata sakit dan merah, demam, malaria, pingsan karena udara panas (heatstroke), menambah napsu makan, kencing manis, disentri, rheumatism, rematik gout, memperbanyak air susu (ASI), datang haid sakit (*dismenorrhoea*), sariawan, infeksi cacicng gelang sedangkan biji digunakan untuk cacingan, impotensi dan kanker.

Bunga digunakan untuk mengatasi gangguan pencernaan. Daun dimanfaatkan untuk pengobatan: cacingan, luka, abses, bisul, erysipelas, terlambat haid, sembelit, menambah napsu makan, sakit lever, demam, melancarkan pengeluaran ASI, sifilis, kencing nanah (*gonorrhoea*), menyuburkan rambut pada anak balita dan akar digunakan untuk mengatasi disentri amuba dan wasir (Syamsuhidayat, 1991. Anonim, 2004. Hien, 1999).

2.1.5 Senyawa kimia dan efek terapi

A. Ekstrak kulit, batang muda, biji dan buah memperlihatkan efek antikarsinogenik terhadap *papiloma* pada kulit mencit, yang diberikan secara

topikal. Senyawa glikosida yang mengandung asam oleanolik sebagai *aglicone* yang diisolasi dari *Momordica cochinchinensis* (spesies yang sama dengan *M.charantia*) memperlihatkan efek hipoglikemik pada tikus diabet (yang diinduksi dengan *streptozotocin*). Senyawa ini diduga sebagai senyawa yang menimbulkan efek hipoglikemik pada *M.charantia*.

B. Buah mengandung vitamin A, B dan C. Sari buah mentahnya mengurangi insidens tumor kulit pada tikus yang diinisiasi dengan *dimethylbenz-[a]anthracene*. *Acylglucosylsterols* yang diisolasi dari buah yang masih muda memperlihatkan efek mutagenesis dan mengurangi *micromucleated polychromatic erythrocytes* yang diinduksi dengan mutagen *mitomycin C* sampai 80% pada mencit. *Chitinase* yang diisolasi dari buah *M.charantia* memperlihatkan efek bakteristatik yang kuat.

C. Biji dan daging buah mengandung senyawa resin, *saponin glycoside cucurbitacin type*, dan alkaloid yang mempunyai efek vomiting dan diare. Protein α -momorcharin dan β -momorcharin dari biji memperlihatkan efek hepatotoksik pada isolat hepar tikus. *Momordin*: beberapa imunotoksin dihasilkan dari penggabungan *type I ribosome-inactivating protein momordin I* dengan antibodi spesifik beberapa sel seperti sel karsinoma kandung kemih, CD^5 dan antibodi monoklonal CD^{22} . Terapi dengan imunotoksin ini ternyata menghambat pertumbuhan tumor *in vitro* sel CD^5 dan CD^{22} . Penggunaannya secara tunggal maupun kombinasi dengan sitostatik lain memperlihatkan efek inhibisi terhadap pertumbuhan tumor secara *in vivo*, misalnya pada tumor tikus yang distimulasi dengan CD^{22} . *MAP30* : Suatu protein antiviral dari *M.charantia*, dapat mempengaruhi replikasi dari *Herpes Simplex Virus (HSV)* bersama-sama dengan

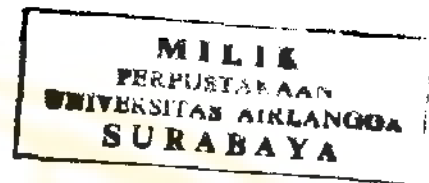
deksametason dan indometasin. *MAP30* juga mampu menghambat infeksi HIV-1 pada T limfosit dan monosit. *M.charantia trypsin inhibitor-II* akan memperpanjang masa prothrombin pada plasma darah manusia (Hayashi K, 1994). Ekstrak biji menyebabkan mortalitas yang tinggi terhadap nematoda *Meloidogyne incognita* dan *Rotylenchulus reniformis*. Suatu inhibitor terhadap endopeptidase *Streptomyces griseus* (*BGIA = Bitter Gourd Inhibitor against an acidic amino acid-specific endopeptidase [Glu S.griseus]*) telah berhasil diisolasi dan sekuensi asam aminonya telah diketahui (Ogata et al, 1991). *MCTI-III (Momordica charantia L. trypsin inhibitor-III)* dan tiga elastase inhibitor (*Momordica charantia L. elastase inhibitor-II, -III, dan -IV*) telah berhasil diisolasi dan sekuensi asam aminonya telah diketahui, setelah Hara et al lebih dulu menemukan *MCTI-I, -II dan MCEI-I* (Hamato et al, 1991. Leluk, 2000).

D. Daun mengandung vit A dan C. Serbuk dan ekstrak *defatted* daun dapat mengurangi efek genotoksik *dimethylnitrosamine, methylmethanesulphonate* dan *tetracycline*. Ekstrak daun juga efektif terhadap kuman *Botryodiplodia theobromae, Curvularia lunata, Phytophthora colocasia* and *Sclerotium rolfsii*. Kostituen aktif dari daun *M.charantia* yang diekstraksi dengan *cold maceration* dengan ethanol 95%, mempunyai efek antimikroba terhadap *Escherichia coli, Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. *Momordicines I dan II* memperlihatkan efek terhadap *Colletotrichum gloeosporioides* (Hien, 1999. Taylor, 2002).

2.2 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei*

2.2.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

<i>Phylum</i>	:	<i>Protozoa.</i>
<i>Subphylum</i>	:	<i>Sporozoa.</i>
<i>Class</i>	:	<i>Telosporea.</i>
<i>Order</i>	:	<i>Haemosporina.</i>
<i>Family</i>	:	<i>Plasmodiidae.</i>
<i>Genus</i>	:	<i>Plasmodium.</i>
<i>Spesies</i>	:	<i>Plasmodium berghei.</i>



Plasmodium berghei merupakan salah satu dari empat spesies plasmodium yang menginfeksi *murine rodent* yang berasal dari Afrika Barat. Ke-empat spesies ini adalah: *P. vinckei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* dan *P. berghei*. Plasmodium ini pada dasarnya merupakan parasit pada tikus tanah (*thicket rats*). Keseluruhan siklus hidup *p.berghei* dan bentuk parasit pada masing-masing fase secara keseluruhan sama dengan parasit malaria pada mammalia. Dimana *P berghei* ini hanya menginfeksi nyamuk *Anopheles*, sporozoitnya haploid dan hanya berkembang pada fase fase hepar. Setelah bermultiplikasi dihepar, kemudian parasit akan menginvasi dan berkembang di eritrosit. Sedangkan perbedaannya yang paling utama dengan malaria pada mammalia hanya pada lamanya pertumbuhan dan ukuran parasit pada masing-masing fase (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 : Perbedaan antara malaria rodensia dengan manusia (Janse, 2002).

	<i>P. berghei</i>	<i>P. yoelii</i>	<i>P. chabaudi</i>	<i>P. vinckei</i>	Human parasites
Merozoites per schizont	12-18	12-18	6-8	6-12	8-16 (32)
Reticulocyte preference	Yes	Yes	No	No	Yes/ No
Synchronous blood infection	No	No	Yes	Yes	Yes/ No
Optimum temperature range mosquito transmission (sporogony)	19-21	23-26	24-26	24-26	>26
Oocyst size (μm) at optimum temperature	<45	60-75	50	45-54	50-60
Sporozoites in glands at optimum temp. (days after infection)	13-14	9-11	11-13	10-13	Dependent on temperature
Mean diameter of mature pre-erythrocytic schizonts in mice/rats (μm)	27	35-50	38-45	35	45-60
Duration of pre-erythrocytic development (hours)	48-52	43-48	50-58	60-72	6-15 days
Duration asexual blood stage cycle (hours)	22-24	18	24	24	48-72
Developmental time gametocytes (hours)	26-30	27	36?	27	48h-12 days
Developmental time ookinete (hours)	18-24	18-24	18-24?	18-24?	12-24
Microgamete (size in μm)	15	16	-	-	16-25
Sporozoite (size in μm)	11-12	14-16	10-15	11-21	10-14
Ookinete (size in μm)	10-12	11	-	8-10	11-20

2.2.2 Morfologi *Plasmodium berghei*

Dalam darah rodensia bentuk plasmodium berghei yang bisa ditemukan ada 4 yaitu : bentuk cincin, trophozoit, skizon dan gametosit (Gambar 2.2).

1. Bentuk Cincin. Tampak sebagai cincin dengan sitoplasma biru dengan nukleus kromatin merah seperti titik (*4-18 hpi*).
2. Bentuk Trophozoit. Berbentuk amuboid atau seperti pipa (*18-20 hpi*).
3. Bentuk Skizon : Ukuran kira-kira $27 \mu\text{m}$ pada hari keempat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak titik-titik kasar berwarna merah gelap (Titik *Maurer*) (*22-23 hpi*).
4. Bentuk Gametosit. Ada dua bentuk gametosit yaitu makrogametosit dan mikrogametosit. Makrogametosit berbentuk pisang, bernoda biru mengandung kumpulan nukleus dan granula, sedangkan bentuk

mikrogametosit seperti ginjal atau kacang, bernoda biru muda atau kemerahan dan mengandung nukleus yang mengkilat dengan granul yang lebih kecil dan tersebar (26-27 hpi).

Pada pemeriksaan darah tepi, baik hapusan darah tebal dan tipis dijumpai terutama parasit muda berbentuk cincin (*ring form*). Pada sediaan darah tebal, sporozoit berbentuk cincin, gametosit berbentuk pisang, dan bentuk cincin banyak dijumpai disisi luar gametosit.

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

Gambar 2.2 : Morfologi *P.berghei* (Janse, 2002).

Pada sediaan hapusan darah tipis tropozoit muda berbentuk tanda seru atau koma dan cincin terbuka, gametosit berbentuk pisang dan terdapat bintik *Murer* pada sel darah merah. Dengan pewarnaan Giemsa, tampak inti berwarna merah, plasma berwarna biru, sel darah berwarna merah muda dan pigmen berwarna kuning tengguli sampai hitam (Carter and Diggs, 1977).

2.2.3 Siklus Hidup.

Siklus hidup malaria terdiri dari 2 fase yaitu siklus aseksual (*skizogoni*) dan siklus seksual (*sporogoni*). Sebagai tempat pembelahan aseksual adalah makhluk vertebrata (hospes antara), sedangkan siklus seksual (*sporogoni*) adalah nyamuk *Anopheles durenii* betina (sebagai vektor dan hospes defenitif). Infeksi dimulai dengan masuknya *sporozoit* melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi parasit. Setelah memasuki aliran darah, *sporozoit* dari *P. berghei* akan mengalami hal sama dengan yang dialami oleh *Plasmodium* yang menyerang manusia, *sporozoit* akan menuju hepar dan menyerang hepatosit. Didalam hepatosit, *sporozoit* berkembang menjadi *tropozoit* dan kemudian sampai *skizon* hepar dewasa dalam waktu 47-52 jam, tiap *skizon* mengandung 1500-8000 *merozoit* yang berinti tunggal. Pembelahan inti menjadi merozoit dimulai 24 jam setelah *sporozoit* memasuki sel hepar dan dalam 26 jam setelahnya terjadi setidaknya 13 kali pembelahan. Kemudian sel hepar akan pecah dan melepaskan merozoit kedalam sirkulasi sistemik dan menyerang eritrosit. Setelah lepas dari sel hepar, *merozoit* akan menginvasi eritrosit, *P. berghei* cenderung menyerang retikulosit tetapi juga menyerang eritrosit dewasa. Di dalam eritrosit merozoit berkembang menjadi *tropozoit* yang ditandai dengan peningkatan ukuran sel dan sitoplasma. *Tropozoit* menggunakan hemoglobin untuk metabolismenya dan menghasilkan hematin, suatu zat parakristal yang berwarna kecoklatan yang tersebar di sitoplasma. Perkembangan merozoit menjadi *tropozoit* dewasa memerlukan waktu sekitar 16 jam. Setelah fase *tropozoit* selesai, parasit akan menggandakan DNA-nya kemudian mengalami pembelahan inti menghasilkan parasit berinti 2 yang disebut *skizon*, pada proses *skizogoni* yang memakan waktu

6-8 jam parasit mengalami pembelahan inti berkali-kali membentuk sel yang berinti 8-24. Setelah proses ini selesai parasit akan membentuk merozoit. Durasi pembentukan merozoit berkisar 22-24 jam. Setelah skizon pecah, merozoit akan menyerang eritrosit baru lagi dan menyebabkan peningkatan parasitemia. Fase untuk perkembangan eritrositik *P.berghei* pada rodensia biasanya asinkron sehingga bentuk-bentuk cincin, tropozoit, dan skizon biasanya ditemukan secara simultan dalam darah saat perjalanan infeksi.

Kemudian sejumlah kecil parasit berhenti membelah secara aseksual dan berdiferensiasi menjadi bentuk seksualnya yang disebut gametosit. Gametosit sendiri terbagi dua yaitu: mikrogametosit (jantan) dan makrogametosit (betina). Pada *P.berghei* di tiap siklus aseksualnya 5-25 % parasit mengalami diferensiasi seksual. Persentasi yang relatif ini berbeda dengan *P.falciparum* dimana laju periode pembelahan aseksualnya berubah seiring laju produksi gametositnya (Janse, 2002).

2.2.4 *Plasmodium berghei* sebagai model untuk riset malaria.

Sejak tahun 1978, studi tentang parasit malaria sangat meningkat terutama studi terhadap parasit *Plasmodium falciparum*. Peningkatan studi ini disusul dengan penelitian terhadap penyakit malaria pada manusia dengan model parasit pada hewan rodensia yang relevan terhadap manusia. *Plasmodium berghei* merupakan salah satu parasit pada hewan rodensia yang dijadikan model penelitian tentang penyakit malaria pada manusia, *Plasmodium berghei* merupakan salah satu dari banyak spesies parasit malaria yang menginfeksi mamalia dan manusia dan merupakan salah satu dari empat spesies yang menginfeksi rodent

murine Afrika yang telah dideskripsikan.

Parasit pada hewan rodensia ini telah dibuktikan analog dengan malaria pada manusia dan primata lainnya terutama pada aspek struktur, fisiologi dan siklus hidup. *Plasmodium berghei* merupakan model yang sangat baik untuk penelitian perkembangan biologi dari parasit malaria oleh karena:

1. Secara biologis parasit pada manusia dan rodensia mempunyai kesamaan.
2. Susunan genome dan genetika antara parasit rodensia dan manusia yang tidak berubah – ubah.
3. Adanya kesamaan karakteristik molekuler terhadap sensitivitas dan resistensi obat.
4. Struktur dan fungsi antigen sebagai target vaksin yang tetap.
5. Manipulasi terhadap siklus hidup secara keseluruhan lebih mudah dan aman termasuk sejak dimulainya infeksi oleh gigitan nyamuk.
6. Kemampuan teknologi yang tersedia untuk pengembangan *plasmodium* ini secara *in-vitro*, produksi dalam jumlah besar serta pemurnian tahapan tahapan siklus hidup.
7. Proses penyusunan gen dan proses biokimiawi antara parasit rodensia dan manusia yang tidak banyak mengalami perubahan.
8. Modifikasi genetik yang telah tersedia.
9. Memungkinkannya pengamatan terhadap interaksi parasit-host baik secara *in vivo* dan *in vitro*.
10. Pengenalan yang baik terhadap *clones* dan *mutant lines* secara genetik.

11. Struktur genetika rodensia sebagai inang yang telah diketahui dengan baik dan jenis transgenik yang telah tersedia dan bermanfaat untuk studi imunologis.

Rodensia yang sering digunakan untuk percobaan (mencit, tikus, hamster) umumnya sensitif terhadap infeksi *P.berghei* baik lewat gigitan nyamuk maupun injeksi dengan darah yang terinfeksi. Penginfeksian dengan menggunakan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* (nyamuk sebagai vektor terbaik pada percobaan) pada mencit bisa dilakukan sejak hari ke-14 setelah nyamuk tersebut menggigit inang yang terinfeksi, sampai beberapa minggu sesudahnya. Pada strain rodensia yang berbeda, kepekaan terhadap infeksi memiliki perbedaan yang cukup besar, sehingga jumlah nyamuk yang dibutuhkan untuk penginfeksian berbeda-beda untuk setiap strain.

Penginfeksian secara buatan dilakukan secara intravena atau intraperitoneal dengan menginjeksikan eritrosit yang mengandung bentuk fase aseksual eritrositiknya (bentuk cincin, trophozoit dan skizon). Prosedur rutin yang banyak digunakan pada penelitian adalah dengan mengambil darah ekor hewan yang terinfeksi dengan parasitemia antara 1-10 % dan menyuntikkan $10^5 - 10^8$ eritrosit yang terinfeksi pada hewan coba secara intraperitoneal (Janse, 2002).

2.3. Malaria dan Patogenesisnya.

2.3.1. Malaria

Malaria adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh protozoa obligat intraselluler dari genus *Plasmodium*. Malaria pada manusia disebabkan *Plasmodium malariae* (Laveran, 1888), *Plasmodium vivax* (Grosi dan Felati,

1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) dan *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922). *Plasmodium* mempunyai siklus hidup yang kompleks, yaitu adanya generasi seksual (sporogoni) yang terjadi dalam tubuh nyamuk dan generasi seksual yang terjadi dalam tubuh manusia. Penularannya dilakukan oleh nyamuk betina dari tribus anopheles (Ross, 1897). Selain gigitan nyamuk penularan dapat secara langsung melalui transfusi darah atau jarum suntik yang tercemar darah penderita serta dari ibu hamil kepada bayinya (Blackman et al, 1998. Gardner et al, 2002. Gunawan S, 2000)

Diantara keempat penyebab malaria tersebut, *Plasmodium falciparum* adalah penyebab malaria yang paling sering menyebabkan malaria berat dan berakhir dengan kematian, terutama pada individu yang tidak kebal dan tidak segera diobati dengan adekuat.

Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* paling banyak menyebabkan penyakit berat yang dapat menunjukkan gejala demam yang persisten, denyut nadi yang cepat, batuk dan kelemahan tubuh dan juga tingkat mortalitas yang tinggi. Simptom timbul ketika parasit menginfeksi eritrosit (siklus eritrosit), sekitar 1 minggu atau lebih setelah digigit nyamuk.

2.3.2. Patogenese Malaria.

Siklus hidup *Plasmodium falciparum* (Gambar 2.3) terbagi atas dua yaitu siklus hidup dalam tubuh manusia (siklus aseksual/skizogoni, **A E**) dan siklus hidup dalam tubuh nyamuk (siklus seksual/sporogoni, **C**) dimulai sejak gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung sporozoit. Sporozoit-sporozoit yang masuk kedalam peredaran darah dalam waktu 30 menit akan memasuki sel-sel

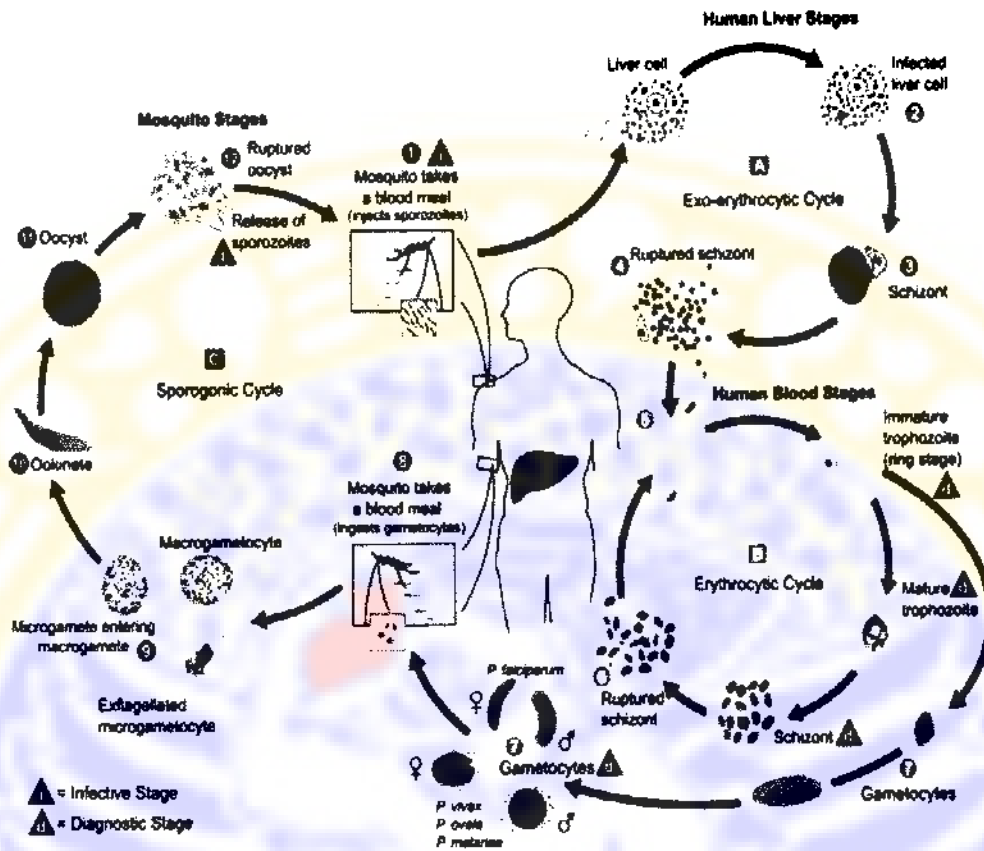
parenkim hati (hepatosit, **A**). *Sporozoit* stadium lever ini akan berubah menjadi puluhan sampai ribuan merozoit yang menyebabkan hepatosit pecah. Merozoit-merozoit **B** ini akan memasuki sirkulasi darah dan memasuki eritrosit yang kemudian berbentuk menjadi sel tunggal dinamakan trophozoit. Berikutnya terjadi pembelahan nukleus beberapa kali dan terus berlangsung sampai parasit menjadi matur. Selanjutnya terjadi proses skizogoni dengan pematangan merozoit, stadium eritrosit pada *Plasmodium falciparum* berlangsung selama 48 jam dan eritrosit yang terinfeksi akan pecah.

Manifestasi klinis malaria berupa demam dan menggigil berhubungan dengan pecahnya eritrosit. Sebagian merozoit akan menginfeksi eritrosit sehat lainnya dan sebagian lagi akan berdiferensiasi membentuk *sexual forms gametosit*. Gametosit inilah yang akan berkembang didalam tubuh nyamuk bila terhisap oleh nyamuk *Anopheles sp* dan akan membentuk sporozoit yang merupakan bentuk infeksi bagi manusia **C** (Hariyanto, 2000).

2.4. Klasifikasi Obat Antimalaria

Berdasarkan kerjanya pada tahapan perkembangan plasmodium, obat anti malaria dibedakan atas (Rang et al , 1995. Sukarban, 1995).

1. ***Blood schizonticides (rapidly acting)***: Klorokuin, Quinine, Mefloquine. Golongan ini digunakan untuk mengendalikan serangan klinik. Bekerja terhadap merozoit eritrosit (fase eritrosit), dengan demikian tidak terbentuk skizon baru sehingga tidak terjadi penghancuran eritrosit. Dengan demikian tidak timbul gejala klinik.



Gambar 2.3 : Siklus hidup *Plasmodium* spp (<http://www.worldhealthspecialists.org/>).

2. **Blood schizonticides (slowly acting):** Pirimethamine, Proguanil. Golongan ini digunakan untuk pencegahan kausal. Dengan cara bekerja terhadap skizon, sehingga tahap infeksi eritrosit dapat dicegah dan transmisi lebih lanjut dapat dihambat.
3. **Tissue schizonticides:** Primaquine Golongan ini digunakan untuk mencegah relaps. Dengan cara bekerja terhadap skizon yang tetap laten di hepar (*dorman*), sehingga relaps tidak timbul kemudian.

2.5 Usaha-Usaha Penemuan Obat Malaria

Dalam usaha penemuan obat malaria yang baru, berbagai usaha/penelitian

banyak yang telah dilakukan. Beberapa metode yang telah dilakukan untuk menemukan dan pengembangan antimalaria diterangkan dibawah ini (Rosenthal, 2003).

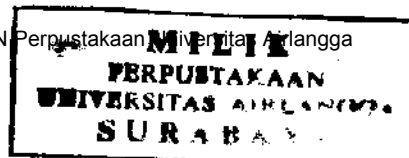
2.5.1 *Optimize therapy with existing agents.*

Usaha-usaha yang pertama kali dilakukan adalah untuk mengoptimalkna efektivitas obat-obat malaria yang telah ada sebelumnya. Regimen dosis dan formulasi yang baru diharapkan dapat meningkatkan aktivitas obat malaria yang telah ada. Terapi kombinasi yang dilakukan termasuk kombinasi dengan agen yang baru (seperti turunan Artemisin, Atovaquone) atau kombinasi diantara obat yang telah ada sebelumnya. Ada dua hal yang diharapkan dari pemakaian kombinasi ini yaitu:

1. Akan meningkatkan efikasi, addiktifitas, dan sinergisme antimalaria yang telah ada.
2. Memperlambat progresifitas resistensi parasit terhadap obat baru. Ini mungkin merupakan harapan yang terpenting dari kombinasi ini.

2.5.2 *Development of analogs of existing agent.*

Pendekatan yang lain yang dilakukan adalah meningkatkan aktivitas obat-obat antimalaria yang telah ada dengan cara memodifikasi susunan kimiawinya. Seperti klorokuin, primakuin dan meflokuin, yang ditemukan dalam usaha mencari obat yang lebih efektif dari kina melalui cara *chemical strategies*. Demikian juga halnya dengan 4-aminokuinolin, yang aktivitasnya lebih tinggi dari klorokuin, mempunyai kedekatan struktur kimiawi yang mirip dengan klorokuin, didapatkan melalui modifikasi struktur kimia dari klorokuin.



Tabel 2.2 : Usaha-usaha penemuan dan pengembangan antimalaria. (Rosenthal, 2003).

Approach	Examples
Optimize therapy with existing agents	Amodiaquine/sulfadoxine/pyrimethamine Amodiaquine/artesunate Artesunate/sulfadoxine/pyrimethamine Artesunate/mefloquine Artemether/lumefantrine Chlorproguanil/dapsone Chlorproguanil/dapsone/artesunate Atovaquone/proguanil
Develop analogs of existing agents	New aminoquinolines New endoperoxide New folate antagonist
Natural products	New natural products
Compounds active against other diseases	Folate antagonists Antibiotic Atovaquone Iron chelators
Drug resistance reversers	Verapamil, desipramine, trifluoperazine Chlorpheniramine
Compounds active against new targets	Tabel 2.3

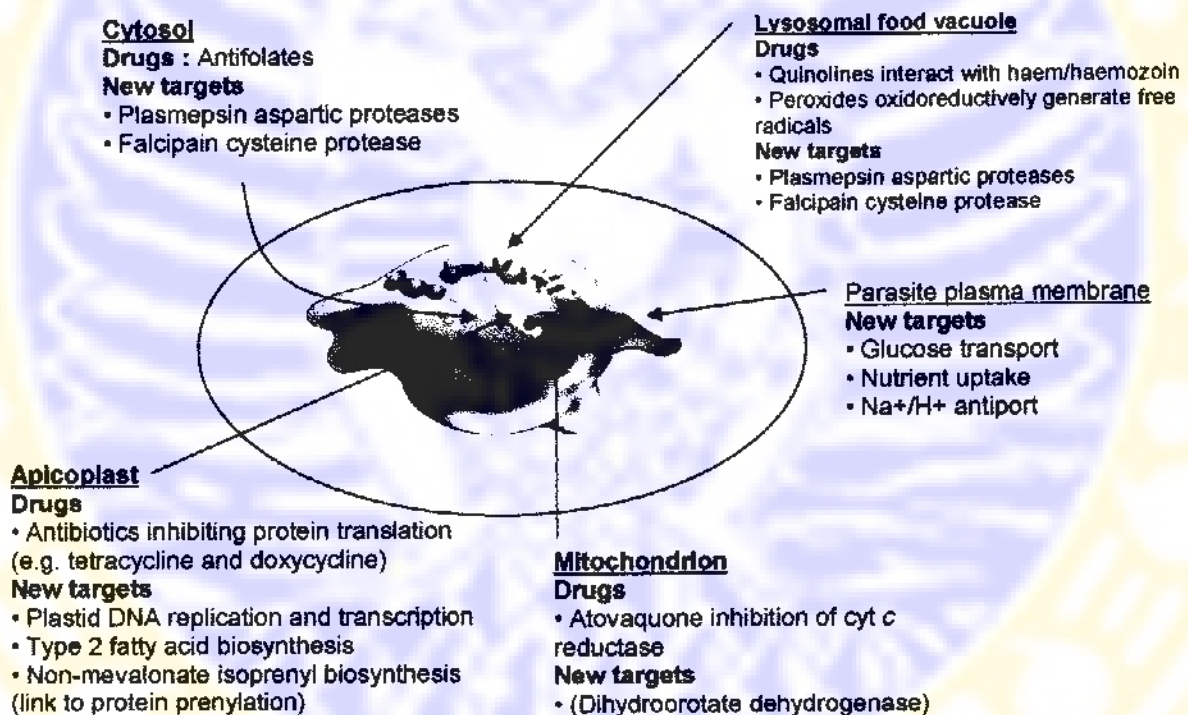
2.5.3 Natural products

Pendekatan ini didasarkan atas pengetahuan akan pemakaian obat-obat tradisional yang digunakan secara empirik di daerah yang endemik malaria untuk mengatasi demam. Dua antimalaria yang penting berasal dari tumbuhan-tumbuhan yaitu Kina dan Artemisin. Tetapi masih perlu dilakukan uji-uji untuk mengevaluasi aktivitas antimalarial dari ekstrak tanaman dan pemurnian zat yang potensial dari ekstrak ini. Seperti golongan kuinolin dan turunan Artemisin, antimalaria dari ekstrak tumbuhan bisa menjadi *parent compounds* untuk menghasilkan obat malaria sintetik atau semi-sintetik baru (Hadi, 2001. Köhler et al, 2002).

2.5.4 Compounds active against other diseases.

Pendekatan keempat adalah mengidentifikasi agen yang digunakan untuk pengobatan obat lain yang mempunyai efek antimalaria. Kandungannya mungkin

bekerja terhadap ortholog dari targetnya atau melalui mekanisme yang lain terhadap parasit malaria. Sehubungan dengan kesulitan dalam menemukan obat antimalaria yang baru, keuntungan dengan metode ini adalah bahwa metode ini tidak membutuhkan biaya yang lebih mahal lagi karena golongan ini telah dikembangkan untuk penggunaan secara klinis pada manusia sesuai dengan indikasinya. Seperti halnya antagonis folate, tetrasiklin dan antibiotik yang lain dikembangkan sebagai antibakterial tetapi belakangan diketahui mempunyai aktifitas terhadap malaria. Hal ini merupakan contoh untuk melakukan skrining terhadap obat antimikroba yang baru dan mempunyai kandungan yang ber-efek sebagai antimalaria (Menezes et al, 2002).



Gambar 2.4: Gambar organella trophozoit plasmodium. Trophozoit yang berada dalam eitrosit dengan organella-organella yang merupakan *drug targets* dari obat malaria yang sudah ada dan target baru yang menjadi fokus beberapa penelitian (Ridley, 2002).

2.5.5 *Drug resistance reversers.*

Beberapa obat lain telah memperlihatkan kemampuan untuk mengembalikan efektifitas klorokuin terhadap *P.falciparum* yang resisten klorokuin secara in-vitro, seperti antihipertensi verapamil dan *muscle relaxant* promethazin (Oduola *et al*, 1998. Warhurst, 2003). Golongan yang paling murah dan sering digunakan yang mempunyai efek *resistance reverses* pada dosis terapi adalah antihistamin *chlorpheniramin*, walaupun *drowsiness* sebagai efek sampingnya membatasi penggunaannya. Jadi walaupun resistensi klorokuin mulai timbul (sebagai antimalaria yang murah, bekerja cepat dan ditoleransi dengan baik), penggunaannya sebagai antimalaria pilihan pertama tetap dapat dipertahankan bila dikombinasi dengan obat yang mempunyai sifat *resistance reverses chloroquine*. Jadi penelitian dan percobaan terhadap obat-obat yang dapat me-reverse resistensi terhadap klorokuin perlu dikembangkan.

2.5.6 *Compounds active against new target.*

Usaha-usaha penemuan antimalaria paling inovatif dan agresif sekarang ini adalah mengidentifikasi gen dan target biologik plasma dari plasmodium dan kandungan dari antimalaria yang bekerja pada target ini (Gambar 2.8 dan Tab 2.2).

Akses yang semakin mudah terhadap sekuensi genome *P.falciparum* memfasilitasi usaha-usaha penemuan ini, walaupun proses ini lebih sulit dan resiko validasi dari kandungan biokimia dan target putative yang sangat terbatas (Gardner *et al*, 2002).

Tabel 2.3 : Kandungan obat antimalaria yang aktif terhadap target lama dan baru. (Rosenthal, 2003).

Target location	Pathway/mechanism	Target molecule	Examples	
			Existing therapies	New compounds
Cytosol	Folate metabolism	Dihydrofolate reductase	Pyrimethamine, proguanil Sulfadoxine, dapsone	Chlorproguanil
	Glycolysis	Dihydropteroate synthase Thymidylate synthase Lactate dehydrogenase		5-fluorocytosine Gossypol derivatives
Parasite membrane	Phospholipid synthesis Membrane transport	Choline transporter Unique channels		G25 Dinucleoside dimers
Food vacuole	Heme polymerization Hemoglobin hydrolysis	Hematin Plasmeypsin Falcipains Unknown	Quinolines Artemisinins	New quinolines Protease inhibitors Protease inhibitors New peroxides
	Free radical generation			
Mitochondrion	Electron transport	Cyt. c oxidoreductase	Atovaquone	
Apicoplast	Protein synthesis DNA synthesis Transcription Type II fatty acid biosynthesis Isoprenoid synthesis Protein farnesylation	Apicoplast ribosome DNA gyrase RNA polymerase FabI FabL DOXP reductoisomerase Farnesyl transferase	Antibiotics Quinolones Rifampin	Thiolactomycin Triclosan Fosmidomycin Peptidomimetics

2.6 Protease dan Invasi dan Rupturnya Eritrosit

Beberapa peneliti sebelumnya telah menduga bahwa invasi eritrosit berkaitan dengan adanya perubahan komponen permukaan sel yang disebabkan oleh *protease chymotripsine-like* parasit. Braun-Breton *et al* yang memfokuskan penelitiannya tentang aktivitas protease malaria, melakukan percobaan invasi merozoit secara *in vitro*. Invasi merozoit ternyata lebih sensitif dengan adanya *chymostatin* sama halnya dengan efek yang ditimbulkan oleh reagen spesifik *serine protease* yaitu *DFP* dan *Pefabloc SC (4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride* (Blackman, 1998).

Protease (falcipain) yang dihasilkan oleh trophozoit muda, terbukti menyebabkan lisisnya eritrosit karena merusak *cytoskeleton* membran, yaitu suatu

membran yang terdapat pada bagian dalam eritrosit dengan komponen utama *heterodimeric protein spectrin* yang berfungsi untuk stabilisasi membran (Hanspal *et al*, 2002).

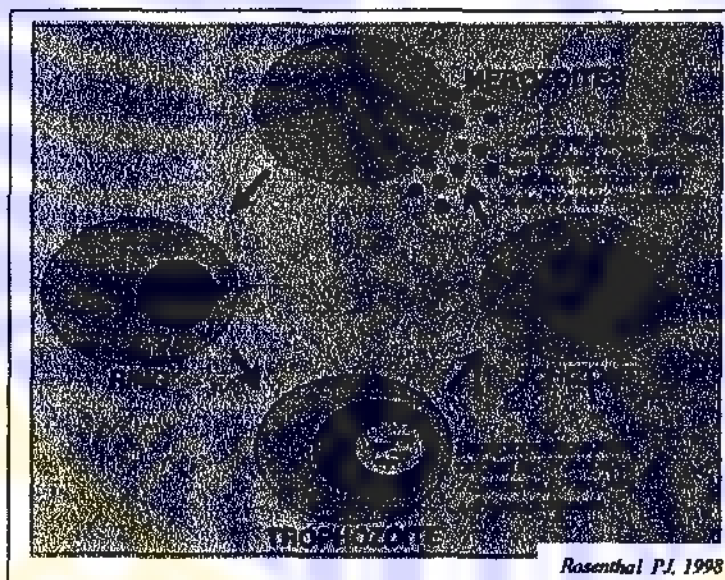
Beberapa protein malaria yang dihasilkan selama fase skizont dan merozoit juga bersifat *proteolytic*. Walaupun peranan yang spesifik dari protease ini belum jelas, tetapi telah terbukti secara konsisten bahwa *cysteine* dan *serine protease inhibitor* menghambat invasi dan rupturnya eritrosit. Selain itu, protease inang juga turut berperan dalam rupturnya eritrosit oleh *P.falciparum*. Pada beberapa studi yang dilakukan oleh Roggwiler *et al*, telah diperlihatkan bahwa urokinase inang berikatan dengan permukaan eritrosit yang terinfeksi *P.falciparum*, dan penurunan kadar urokinase pada medium kultur menghambat rupturnya eritrosit oleh skizont matur. Schrevel J *et al* dan Mayer R *et al* memperlihatkan bahwa suatu peptida inhibitor sintetik (*Pf 68*) terbukti menghambat invasi parasit pada media kultur. Hal ini membuktikan bahwa suatu protease spesifik dibutuhkan oleh parasit malaria waktu menginvasi eritrosit dan ini merupakan suatu target yang potensial untuk pengembangan obat malaria baru (Blackman, 1998).

2.7 Katabolisme Hemoglobin dan Detoksifikasi Haem didalam Plasmodium

Merozoit merupakan fase ekstraselluler malaria yang berlangsung sangat singkat dan segera menginvasi eritrosit. Kemudian berubah menjadi bentuk cincin sebelum menjadi *tropozoit*. Bentuk *tropozoit* merupakan bentuk yang paling aktif metabolismenya selama siklus hidup parasit ini. Dalam 38 jam, *tropozoit* ini akan

matang menjadi shizont dan menghasilkan merozoit baru, yang akan dilepaskan kembali ke dalam darah seiring dengan rupturnya eritrosit. Merozoit ini akan kembali mengivasi eritrosit dan melanjutkan siklusnya kembali.

Tropozoit akan mengambil dan mendegradasi sebagian besar hemoglobin (60-80 %) dalam eritrosit. Parasit ini memerlukan asam amino sebagai sumber protein yang dihasilkan dari degradasi hemoglobin. Selain untuk mendapatkan asam amino, parasit mendegradasi hemoglobin untuk mendapatkan ruang yang lebih untuk dirinya sendiri dan untuk mempertahankan tekanan osmotik eritrosit. Proses degradasi Hb dimulai dengan diambilnya sitosol eritrosit kedalam organella khusus yang disebut *food vacuole (FV)* dengan suatu zat pembawa (*transport vehicle*) melalui *cytostome* (suatu struktur yang terbentuk melalui proses invaginasi pada *parasitophorous vacuolar membrane*).

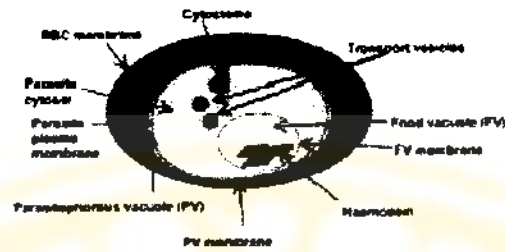


Gambar 2.5 : Skema target protease pada daur hidup malaria fase eritrosit. Skema diatas menunjukkan posisi protease pada berbagai stage parasit sebagai target kemoterapi.

FV ini mengandung beberapa enzim proteolitik yang bekerja pada Hb yang diambil. Untuk mendegradasi hemoglobin ini setidaknya dilakukan oleh 3 kelas enzim yang ada dalam FV yaitu *aspartic proteases (plasmepsins I, II dan IV dan histo-aspartic protease or HAP)*, *cysteine proteases (falcipain-1, 2 and 3)* dan *zinc metalloprotease (falcylisin)*.

Plasmepsin I dan II sangat aktif dalam proses degradasi Hb sedangkan *plasmepsin IV* mempunyai efek proteolitik yang lemah, tetapi akan bekerja secara sinergis dengan *plasmepsin I dan II*. *HAP* bekerja pada globin, dan tidak mempengaruhi Hb. *Falcipain-2* juga tidak mempengaruhi Hb, tetapi bekerja pada globin hasil degradasi. *Falcylisin* bekerja pada peptida hasil degradasi dengan memecahnya kedalam fragmen yang lebih kecil. Semua enzim ini akan bekerja bersama-sama terhadap Hb. *Plasmepsin I dan II* akan memecahkan Hb, kemudian *plasmepsin IV* dan *HAP* akan mendegradasi hemoglobin untuk menghasilkan globin sedangkan *falcipain-2* akan menghidrolisis fragmen globin ini. Dengan efek proteolitik dari *falcylisin*, peptida ini akan dirubah menjadi oligomer. Kemudian oligomer peptida ini akan dihidrolisis menjadi asam amino di sitoplasma parasit setelah dieksport dari FV. Jadi penghambatan kerja protease ini merupakan suatu target antimalarial yang relevans.

Selain globin, haem (*ferroprotoporphyrin IX* atau *Fe(II)PPIX*) juga akan dihasilkan selama proses hidrolisis Hb. Melalui proses autooksidasi haem akan diubah menjadi hematin (*aqua/hydroxoferroprotoporphyrin IX* atau *H₂O/HO-Fe(III)PPIX*) (Egan, 2004).



Egan TJ, 2004

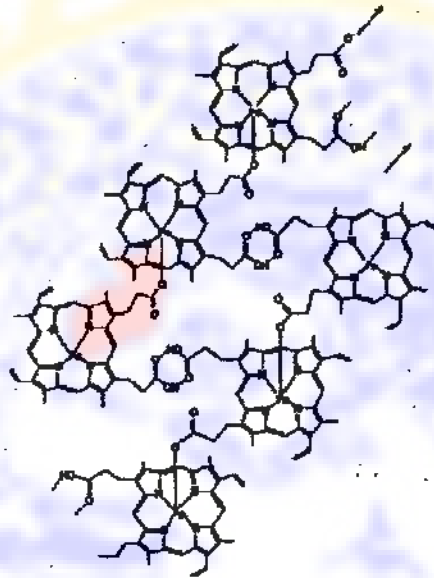
Gambar 2.6 : Gambar eritrosit yang mengandung parasit. Parasit tinggal dalam suatu *parasitophorous vacuole* dan sitosol eritrosit akan diambil oleh parasit melalui *cytosome*. Sitosol eritrosit ini diangkut oleh suatu *transport vehicle* ke dalam *FV*. Degradasi Hb terjadi didalam *FV* dan menghasilkan hematin. Konversi hematin menjadi haemozoin juga terjadi dalam *FV*. Globin yang dihasilkan akan dieksport ke sitosol parasit untuk menghasilkan asam amino

Haem ini bersifat toksik terhadap malaria, oleh karena itu untuk mencegah efek toksiknya, parasit akan mendetoksifikasi zat ini. Parasit malaria mempunyai mekanisme yang khas untuk mendetoksifikasi haem yang dikenal dengan "*heme polymerase*". Hasil detoksifikasi haem bebas ini berupa zat yang insolubel, berbentuk mikrokristal, berwarna coklat gelap yang tersebar didalam *FV* parasit yang dikenal sebagai *hematin (malaria pigment)* (Tripathi and Tekwani, 1999).

2.8 Hematin

Pigmen malaria telah lama menarik perhatian para malariologist. Meckel (1847) merupakan orang pertama yang menandai pigment dalam darah dan spleen manusia. Kemudian Virchow (1849) menggambar dan menerangkan bentuk pigment pada pasien penderita malaria kronik. Dialah orang yang pertama yang menghubungkan keberadaan pigment ini dengan malaria. Pada tahun 1850, Hischl mengkonfirmasi adanya pigment pada demam yang intermitten. Akhirnya Laveran (1880) berhasil menghubungkan semua penemuan diatas setelah menemukan adanya parasit yang mengandung pigmen (*pigmented parasites*) pada

tentara Algerian. Dia berhasil mengidentifikasi sel yang mengandung pigment (*cell pigmented*) pada 26 orang lebih penderita malaria. Pada tahun 1890 Golgi berhasil dan merupakan orang pertama yang mendokumentasikan pigmen pada parasit malaria dengan fotografi.



Gambar 2.7: Struktur molekul hematin. Dua unit heme pada rantai polymer heme dihubungkan oleh ironcarboxylate bond, dimana kedua polymer heme dihubungkan oleh *hydrogen bond*. (Tripathi and Tekwani, 1999)

Brown (1911) membedakan pigmen malaria dengan melanin dan menarik kesimpulan bahwa zat ini merupakan asal muasal hematin. Dia juga menyatakan pigmen malaria yang coklat kehitaman merupakan hematin tetapi masih belum murni. Brown juga menduga bahwa kerja enzim proteolitik pada hemoglobin merupakan kemungkinan besar penyebab adanya malaria pigmen. Sinton dan Gosh (1934) memberikan nama "*haemozoin*" untuk menggantikan nama "*plasmodin*" dan "*haemo-melanin*". Pada dua penelitiannya Ghosh and Nath

(1934) dan Ghosh *and* Sinton (1934) memperlihatkan bahwa haemozoin mengandung besi dan spektrum haemozoin dalam preparasi alkalin identik dengan haeme. Pada tahun 1991, Slatter *et al* memberi postulat akan ikatan *iron-carboxylate* yang unik antara dua haem pada haemozoin dengan spektroskopi infrared dan X-ray (Sullivan, 2002).

Hematin merupakan unsur utama hemozoin. Dalam suasana basa haemozoin akan larut dan melepaskan hematin. Dengan dasar ini, dua percobaan yang dilakukan oleh Ginsburgh H (1998) dan Loria P (1999) mencoba mendapatkan kuantitas hematin dengan menghitung daya absorbans hematin yang sudah dilarutkan.

BAB 3**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN****3.1 Kerangka Konsep**

Infeksi dimulai dengan masuknya sporozoit melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi parasit. Sporozoit-sporozoit yang masuk kedalam peredaran darah dalam waktu 30 menit akan memasuki sel-sel parenkim hati (hepatosit). Sporozoit stadium lever (fase ekstraeritrosit) ini akan berubah menjadi puluhan sampai ribuan merozoit yang menyebabkan hepatosit pecah. Merozoit-merozoit ini akan memasuki sirkulasi darah dan memasuki eritrosit yang kemudian berbentuk menjadi sel tunggal dinamakan tropozoit. Berikutnya terjadi pembelahan nukleus beberapa kali dan terus berlangsung sampai parasit menjadi matur. Selanjutnya terjadi proses skizogoni dengan pembentukan merozoit, stadium eritrosit pada *Plasmodium falciparum* berlangsung selama 48 jam dan eritrosit yang terinfeksi akan pecah dan melepaskan eritrosit ke plasma darah dan kembali menginfeksi eritrosit lain.

Tropozoit ini akan mengambil dan mendegradasi sebagian besar hemoglobin (60-80%) dalam eritrosit. Parasit ini memerlukan asam amino sebagai sumber protein yang dihasilkan dari degradasi hemoglobin. Selain untuk mendapatkan asam amino, parasit mendegradasi hemoglobin untuk mendapatkan ruang yang lebih untuk dirinya sendiri dan untuk mempertahankan tekanan osmotik eritrosit. Proses degradasi Hb dimulai dengan diambilnya sitosol eritrosit kedalam organella khusus yang disebut *food vacuole* (FV) dengan suatu zat pembawa (*transport vehicle*) melalui *cytostome* (suatu struktur yang terbentuk

melalui proses invaginasi pada *parasitophorous vacuolar membrane*). FV ini mengandung beberapa enzim proteolitik yang bekerja pada Hb yang diambil. Untuk mendegradasi hemoglobin ini setidaknya dilakukan oleh 3 kelas enzim yang ada dalam FV yaitu *aspartic proteases* (*plasmepsins I, II dan IV* dan *histo-aspartic protease or HAP*), *cysteine proteases* (*falcipain-1, 2 and 3*) dan *zinc metalloprotease* (*falcylisin*). *Plasmepsin I* dan *II* sangat aktif dalam proses degradasi Hb sedangkan *plasmepsin IV* mempunyai efek proteolitik yang lemah, tetapi akan bekerja secara sinergis dengan *plasmepsin I* dan *II*. *HAP* bekerja pada globin, dan tidak mempengaruhi Hb. *Falcipain-2* juga tidak mempengaruhi Hb, tetapi bekerja pada globin hasil degradasi. *Falcylisin* bekerja pada peptida hasil degradasi dengan memecahnya kedalam fragmen yang lebih kecil. Semua enzyme ini akan bekerja bersama-sama terhadap Hb. *Plasmepsin I* dan *II* akan memecahkan Hb, kemudian *plasmepsin IV* dan *HAP* akan mendegradasi hemoglobin untuk menghasilkan globin sedangkan *falcipain-2* akan menghidrolisis fragmen globin ini.

Dengan efek proteolitik dari *falcylisin*, peptida ini akan dirubah menjadi oligomer. Kemudian oligomer peptida ini akan dihidrolisis menjadi asam amino untuk keperluan protein parasit di sitoplasma parasit setelah dieksport dari FV.

Selain globin, haem (*ferroprotoporphyrin IX* atau *Fe(II)PPIX*) juga akan dihasilkan selama proses hidrolisis Hb. Haem ini bersifat toksik terhadap malaria, oleh karena itu untuk mencegah efek toksiknya, parasit akan mendetoksifikasi zat ini. Parasit malaria mempunyai mekanisme yang khas untuk mendetoksifikasi haem yang dikenal dengan "*heme polymerase*". Hasil detoksifikasi haem bebas ini berupa zat yang insolubel, berbentuk mikrokristal, berwarna coklat gelap yang

tersebar didalam *FV* parasit yang dikenal sebagai *hematin (malaria pigment)* (Tripathi and Tekwani, 1999).

Momordica charantia L. atau yang dikenal sebagai Pare merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria, selain peluruh dahak, obat cacing dan anti diabetes (Hien, 1999. Syamsuhidayat, 1991). Dengan pendekatan etnofarmakologi *Momordica charantia L.* telah digunakan sebagai antimalaria dan mengobati demam di Brazil, Guatemala, Peru, India, Nikaragua, USA, Venezuela, Mexico, dan Indonesia. Bagian yang digunakan adalah akar, batang, daun, bunga dan buah (Hadi S, 2001. Köhler, 2002. Syamsuhidayat SS, 1991. Taylor L, 2002).

Ueno, Doyama, dan Padovani E Salata (1996) di Brazil, meneliti efek antimalaria *in vivo* dari ekstrak etanol batang dan infusian daun *Momordica charantia L.* terhadap mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan kedua ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antimalaria dengan dosis masing-masing 1 gr/kgbb (Taylor L, 2002). Percobaan secara *in vitro* aktivitas antimalaria dari ekstrak lipophilik batang dan daun *Momordica charantia L.* yang dilakukan oleh Köhler *et al* memperlihatkan efek antimalaria dengan IC_{50} 6-25 $\mu\text{m/ml}$ terhadap *Plasmodium falciparum* (Köhler, 2002).

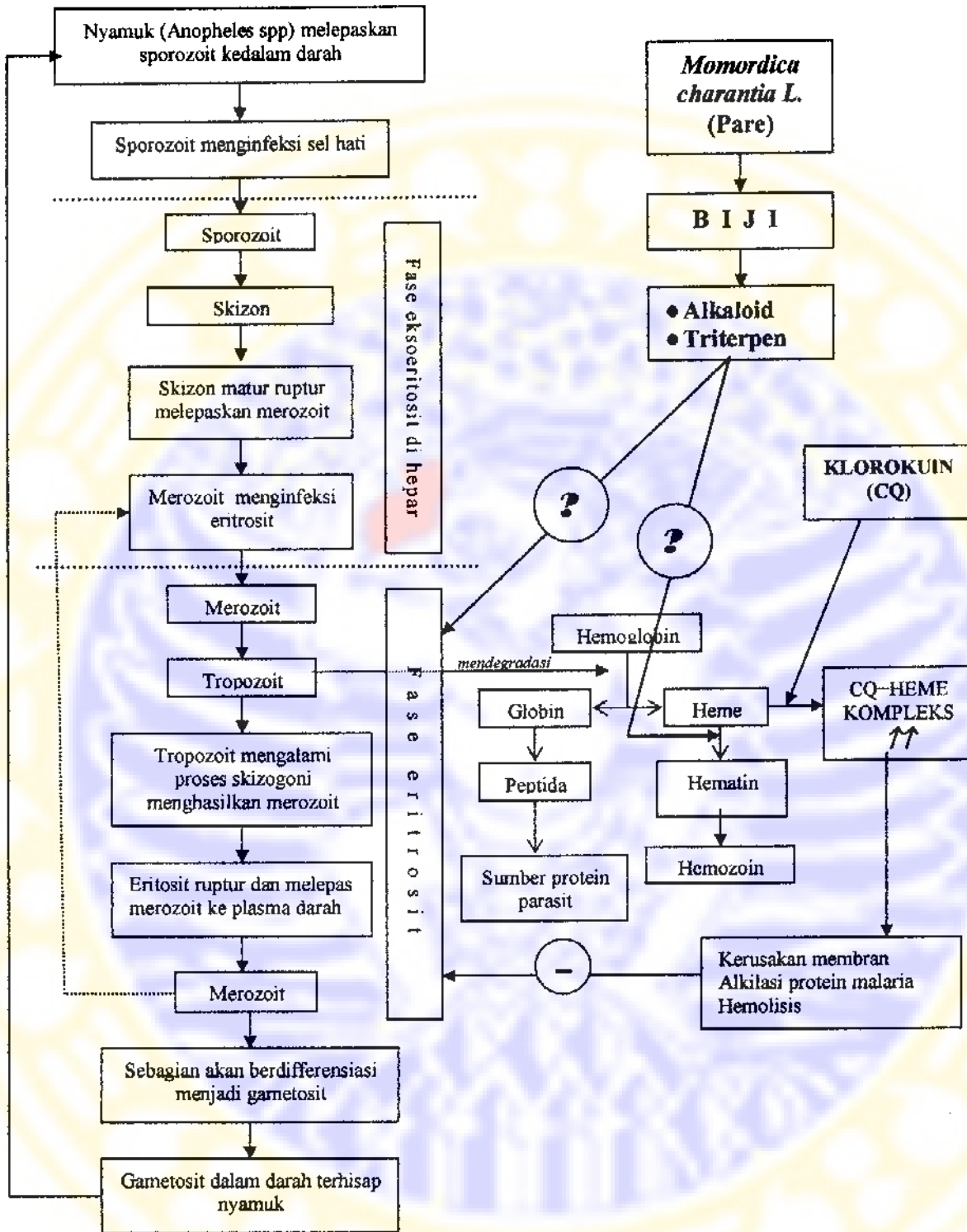
Banyak golongan senyawa dari tumbuhan yang bersifat antimalaria, tetapi beberapa senyawa yang penting dan mempunyai biopotensi antimalaria antara lain: alkaloid, lakton, terpenoid, xanton dan flavonoid (Saxena, 2003. Ignatushchenko *et al*, 1997). Kandungan senyawa yang terdapat dalam biji *Momordica charantia L.* antara lain resin, triterpen, proteid, lipid, steroid, karbohidrat, alkaloid, glikosida saponin tipe *cucurbitacin* (Taylor L, 2002. Hien,

1999, Syamsuhidayat, 1991). Dari senyawa yang dikandung biji *Momordica charantia L.* tersebut ada beberapa senyawa yang berefek antimalaria yaitu triterpen dan alkaloid.

Selain untuk melihat pengaruhnya terhadap penghambatan pertumbuhan parasit, penelitian ini juga bertujuan untuk melihat pengaruh ekstrak air biji *Momordica charantia Linn* (pare) terhadap kadar hematin yang dihasilkan pada darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

3.2 Hipotesis

1. Ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia L.*) menurunkan kadar parasitemia mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*
2. Ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia L.*) menghambat pertumbuhan *plasmodium* mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.
3. Ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia L.*) menurunkan kadar hematin darah mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.



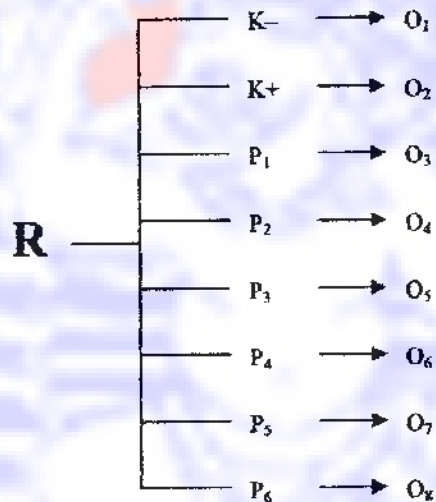
Gambar 3.1 : Bagan Kerangka Konseptual

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *The Posttest-Control Group Design* (pengambilan data dilakukan setelah perlakuan) dan dibandingkan dengan kontrol (Nazir, 1985), dengan rancangan percobaan sebagai berikut:



Gambar 4.1: Rancangan Percobaan

Keterangan:

- R = Sampel (mencit diinfeksi P berghei)
 K+ = Kontrol positif
 K- = Kontrol negatif
 P = Perlakuan
 O = Pengamatan

Tabel 4.1 : Rancangan Pelaksanaan.

No	Hari ke-	KELOMPOK							
		K+	K-	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆
1	I	Inokulasi Plasmodium berghei secara i.p sebanyak 10 ⁷ parasit dalam 0,2 ml darah							
2	IV = H1	CQ = 10 mg/kgbb	Larutan pembawa CMCNa 0,5% 0,2ml	Ekstrak air biji Pare = 0.01 mg/kgbb	Ekstrak air biji Pare = 0.1 mg/kgbb	Ekstrak air biji Pare = 1 mg/kgbb	Ekstrak air biji Pare = 10 mg/kgbb	Ekstrak air biji Pare = 100 mg/kgbb	Ekstrak air biji Pare = 1000 mg/kgbb
3	V = H2								
4	VI = H2								
5	VII = H4								
6	VIII	24 jam setelah pemberian dosis terakhir dilakukan pengambilan darah secara intrakardial untuk pemeriksaan kadar hematin dan parasitemia							

Ket :

- * Pemeriksaan kadar parasitemia (pembuatan hapusan darah tipis) dilakukan sebelum pemberian perlakuan berikutnya
- H₁-H₄ = Perlakuan hari ke-1 s/d hari ke-4
- H₀ = Kadar Parasitemia Awal
- K+ = Kontrol Positif
- K- = Kontrol Negatif
- P₁-P₆ = Kelompok Perlakuan 1 s/d 6

4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.

Pada penelitian ini digunakan 6 (enam) kelompok hewan coba dan masing-masing 1 (satu) kelompok kontrol negatif dan positif. Setiap kelompok masing-masing dengan 3 (tiga) replikasi. Besarnya replikasi didapatkan dengan rumus sebagai berikut (Saunders-Dawson, 1994).

Persamaan 4.1 Rumus Pengambilan Sampel.

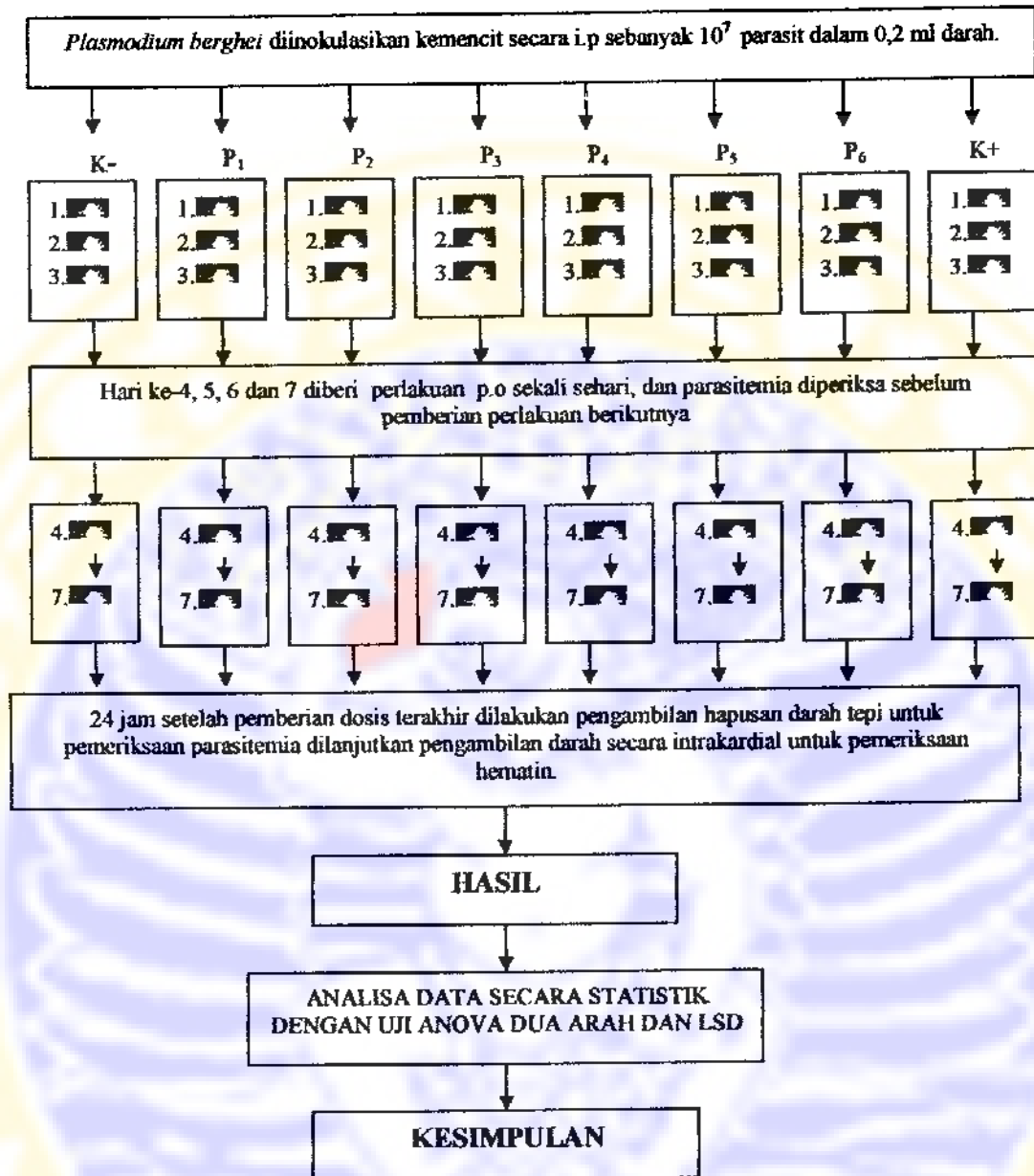
$$n = \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta)S}{d} \right]^2$$

Ket:

- Z α = batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas kemaknaan
- Z β = batas bawah nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas kemaknaan
- S = standar deviasi perkiraan perbedaan
- d = mean deviasi perbedaan.

Dari penelitian sebelumnya tentang aktivitas antimalaria bahan alam terhadap *Plasmodium berghei* didapatkan standar deviasi (S) = 5.35 (3.6 – 7.1), dengan rata-rata perbedaan (d) = 4.4 -13.7 (Franssen, 1997). Dengan $\alpha = 0.05$ ($Z\alpha = 1.96$, $Z\beta = 1.645$) maka didapatkan jumlah sampel (n) = 1.96 \approx 2, maka jumlah sampel minimal 2, dalam penelitian ini jumlah sampel (n) = 3.

Sampel penelitian ini adalah darah mencit (*Mus musculus L. strain balb/c*). Besar sampel adalah 3 untuk setiap kelompok sehingga sampel penelitian yang diperlukan sejumlah 24 ekor mencit. Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana dengan teknik undian. Pemberian nomor masing-masing hewan coba disesuaikan dengan kelompok dan jenis perlakuan. Kemudian dilakukan pemilihan undian secara acak terhadap nomor hewan coba untuk menetapkan sampel. Setiap hewan coba digunakan untuk satu kali percobaan.



Gambar 4.2 : Bagan Alur Penelitian

Keterangan :

- K+ = Klorokuin 20 mg/kgBB
- K- = Larutan CMCNa 0,5 %
- P₁ = Ekstrak air biji Pare 0.01 mg/kgBB
- P₂ = Ekstrak air biji Pare 0.1 mg/kgBB
- P₃ = Ekstrak air biji Pare 1 mg/kgBB
- P₄ = Ekstrak air biji Pare 10 mg/kgBB
- P₅ = Ekstrak air biji Pare 100 mg/kgBB
- P₆ = Ekstrak air biji Pare 1000 mg/kgBB

4.3 Variabel Penelitian.

4.3.1 Klasifikasi variabel.

- A. **Variabel bebas** : Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji pare (*Momordica charantia L.*).
- B. **Variabel kendali** : Variabel kendali dalam penelitian ini adalah: Hewan coba, umur, strain, berat badan, makanan dan minuman, kandang, tablet klorokuin, alat-alat yang digunakan, dan lama perlakuan.
- C. **Variabel intervening** : Variabel intervening dalam penelitian ini adalah *Plasmodium berghei* galur ANKA.
- D. **Variabel tergantung**: Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar parasitemia dan panjang gelombang *alkaline hematin* dan *oxyhemoglobin* dalam darah hewan coba.

4.3.1 Defenisi operasional variabel

- A. **Variabel bebas** : Ekstrak biji pare yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam dosis 0.01; 0.1; 1; 10; 100 dan 1000 mg/kgbb mencit yang diberikan secara oral dengan sonde dimulai pada hari ke-3 setelah inokulasi *Plasmodium berghei* (dianggap sebagai hari ke-1 perlakuan = D₁) pada mencit yang sehat. Perlakuan kemudian dilanjutkan pada hari ke-4 (D₂), ke-5 (D₃), ke-6 (D₄) dan ke-7 (D₄) dengan dosis dan cara sama (Phillipson, 1991. Fidock, 2004).
- B. **Variabel kendali** :
Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina (*Mus musculus L.*) galur balb/c dengan berat badan 20-30 gram, umur ± 2 bulan, yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Makanan yang diberikan sesuai dengan

standar Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

Kandang yang digunakan adalah kandang milik Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Tablet klorokuin yang digunakan adalah klorouin difosfat p.a yang diperoleh dari *Sigma*, yang diberikan pada kelompok kontrol positif dengan dosis terapi 10 mg/kgbb (Philippson, 1991).

Alat-alat yang digunakan meliputi alat untuk pemeriksaan parasitemia dan menscanning panjang gelombang *alkaline hematine* dan *oxyhemoglobin*. Lama perlakuan dimulai sejak inokulasi plasmodium berghei sampai pembunuhan tikus untuk pengambilan darah selama 8 hari.

C. Variabel intervening : Variabel intervening dalam penelitian ini adalah suspensi darah yang mengandung 10^7 parasit yang didapatkan dari mencit donor yang telah terinfeksi *Plasmodium berghei*.

D. Variabel tergantung : Variabel tergantung dalam penelitian adalah tingkat parasitemia dari mencit coba dan panjang gelombang *alkine hematin* dan *oxyhemoglobin* pada darah mencit.

4.3 Bahan-bahan Penelitian

4.4.1 Bahan tanaman

Biji Pare (*Momordica charantia* L.) didapatkan dari buah pare yang sudah matang. Buah pare yang sudah matang ditandai dengan perubahan warna buah dari hijau berubah menjadi oranye yang pecah dengan tiga katup, biji berwarna coklat kekuningan, bentuknya pipih memanjang, dan keras. Biji *M Charantia*

diperoleh Surabaya, Jawa Timur dan dideterminasi di Kebun Raya Purwodadi , Pasuruan, Jawa Timur. Diekstraksi di Lab Ekstraksi Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.

4.4.2 *Plasmodium berghei* : *Plasmodium berghei* yang digunakan adalah *Plasmodium berghei* strain ANKA yang diperoleh dari Lembaga Biomolekuler Eijkman, Jakarta.

4.4.3 Bahan untuk pemeriksaan parasitemia : Hapusan darah tipis, larutan PBS, pewarna Giemsa, buffer fosfat, dan minyak imersi.

4.4.4 Bahan untuk pemeriksaan *Alkaline Hematin* dan *Oxyhaemoglobin* : Darah mencit yang telah terinfeksi, EDTA, aquades, dan alkaline alkohol.

4.4.5 Bahan pelarut : Pelarut yang digunakan antara lain: aquadestillata, CMCNa 0,5 %, alkalin alkohol.

4.4.6 Bahan habis pakai : Kapas, tissue, spuit dan alkohol.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat untuk ekstraksi

Timbangan, toples, penangas air, corong pisah, gelas ukur, gelas beker, tabung erlenmeyer, *freeze drying*, dan batang pengaduk.

4.5.2 Alat untuk pemeriksaan parasitemia : Hemositometer, syringe, mikroskop, gelas objek, mikropipet dan tip, gelas ukur, pipet volum 1 dan 5 ml.

4.5.3 Alat untuk pemeriksaaan panjang gelombang Alkalin hematin dan oxyhaemoglobin : Alat yang yang digunakan adalah *Spectrophotometer* cahaya tampak dengan panjang kuvet 0.5 cm.

4.6 Persiapan Penelitian

4.6.1 Pembuatan ekstrak

Ekstraksi terhadap biji Pare (*Momordica charantia L.*) dilakukan dengan mengikuti prosedur ekstraksi sebagai berikut: biji *M charantia L* dikeringkan tanpa menggunakan suhu tinggi (tidak dengan sinar matahari langsung), dengan sirkulasi udara yang baik. Kemudian dengan menggunakan mesin penggiling, biji dihaluskan untuk mendapatkan serbuk halus. Serbuk halus kering sebanyak 50 g dicampur dengan 500 cc air, kemudian dipanaskan diatas air tangas selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90^o C sambil sekali-kali diaduk. Kemudian diserkai dengan kertas saring selagi panas, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai didapatkan volume 500 cc. Setelah dingin dilakukan *freeze dried*, sehingga didapatkan ekstrak air biji *Momordica charantia L.*

4.6.2 Persiapan hewan coba

Mencit sebagai hewan coba diadaptasikan dalam kandang yang dirancang khusus selama 3 hari sebelum diberi perlakuan. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum* sesuai dengan standar Pusat Veteriner Farma (Pusvetma).

4.6.3 Inokulasi *Plasmodium berghei*

Inokulasi dilakukan secara intra peritoneal (i.p) sebanyak 10⁷ parasit dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit. Jumlah eritrosit/ml darah dan parasitemia mencit donor yang akan ditransfer terlebih dahulu dihitung. Untuk menghitung jumlah eritrosit, darah diambil dari ujung ekor sebanyak 10 µl dan dilakukan pengenceran 10³x dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung eri *Naubauer (Hemositometer)*. Parasitemia dihitung dari sediaan hapusan darah tipis yang telah dipulas dengan pewarnaan *Giemsa 10%*. Jumlah

parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop dengan pembesaran 1000x. Dengan mengalikan jumlah eritrosit/ml darah dengan parasitemia, didapatkan jumlah parasit /ml darah. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan larutan PBS untuk mendapatkan konsentrasi parasit 10^7 dalam 0,2 ml darah, kemudian larutan tersebut ditransfer secara i.p kemencit perlakuan.

4.7 Tahap Pelaksanaan

4.7.1 Pemberian perlakuan.

Mencit yang sudah diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dibagi dalam 6 kelompok perlakuan, dan masing-masing 1 kelompok kontrol positif, dan kontrol negatif. Kelompok kontrol positif diberi klorokuin dengan dosis 10 mg/kg bb dalam 0,2 ml aquades. Kelompok kontrol negatif diberi larutan pembawa CMCNa 0,5% 0,2 ml. Kelompok perlakuan diberi ekstrak biji pare dengan dosis masing-masing 0.01; 0.1; 1; 10; 100 dan 1000 mg/kgbb mencit yang diberikan secara oral dengan sonde dalam 0,2 ml suspensi 0,5 % CMCNa. Perlakuan diberikan setelah 3 hari inokulasi *Plasmodium berghei* pada mencit yang sehat, kemudian dilanjutkan pada hari ke-4, 5 dan 6 dengan dosis dan cara sama.

4.7.2 Pemeriksaan parasitemia

A. Pembuatan hapusan darah tipis. Diambil tetes darah dari ekor mencit dengan cara menggantung ekor mencit dan ditetaskan pada ujung gelas objek. Dengan bantuan satu sisi gelas objek yang lain, ratakan suspensi sel parasit tersebut. Lalu biarkan sampai kering di udara terbuka. Kemudian hapusan darah tipis tersebut difiksasi dalam methanol absolut selama \pm 1-5 detik, biarkan kering

diudara terbuka. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan *Giemsa* 10%, biarkan selama \pm 30 menit, pulas dengan air mineral dan dikeringkan.

B. Penghitungan parasitemia

Penghitungan parasitemia dilakukan setiap hari sebelum diberi perlakuan. Jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dihitung tiap 1000 eritrosit dengan mikroskop perbesaran 1000 kali. Parasit malaria ditandai dengan inti berwarna merah dengan plasma berwarna biru sedangkan sel darah berwarna merah muda.

4.7.3 Uji aktivitas antimalaria ekstrak biji Pare.

Uji aktivitas antimalaria yang dilakukan merupakan modifikasi dari "*The 4-days suppressive test of blood schizontocidal action*" dari *Peter's Test* (Phillipson, 1991). Setelah kadar parasitemia didapatkan, maka perbedaan rata-rata antara kontrol (dianggap 100%) dengan rata-rata perlakuan merupakan nilai reduksi (= aktivitas) dari ekstrak, dengan cara penghitungan sebagai berikut:

Persamaan 4.1 Aktivitas Antimalaria.

$$\text{Activity} = 100 - \left\{ \frac{\text{mean parasitemia treated}}{\text{mean parasitemia control}} \times 100 \right\}$$

Ket.

Mean parasitemia treated:	Rata-rata kadar parasitemia pada mencit yang mendapat perlakuan dengan ekstrak air biji pare.
Mean parasitemia control :	Rata-rata kadar parasitemia pada mencit yang mendapat perlakuan dengan larutan pembawa (kontrol negatif).
Activity :	Nilai reduksi (= aktivitas) dari ekstrak air biji pare

4.7.4 Penentuan kadar hematin

A. **Persiapan sampel** : Setelah 24 jam pemberian dosis terakhir (8 hari setelah infeksi), tikus dibunuh untuk diambil darahnya secara intra kardial dan dilakukan pemeriksaan alkalin hematin dan oxyhemoglobin (Ball *et al*, 1948).

B. **Pemeriksaan hematin**

Kadar hematin didapatkan melalui perbandingan antara total alkaline hematin dengan oxyhemoglobin secara spektroskopik menurut Ball *et al* (Ball *et al*, 1948). Sampel darah dilarutkan dalam aquades untuk menghitung densitas oxyhemoglobin dan dilarutkan dalam alkalin alkohol (0,04 gm KOH dalam 80% ethyl alkohol) untuk menghitung densitas alkaline hematin, dengan perbandingan 1:6 kemudian didiamkan selama 15 menit. Setelah itu disentrifus beberapa saat sampai terjadi ekstraksi lengkap ditandai dengan putihnya presipitat. Kemudian densitas optik (*optical density*) supernatan dibaca dengan spektrophotometer (*Spectrophotometer* cahaya tampak). Nilai $\log I_0/I$ dari supernatant dibaca dalam kuvet 0,5 cm dengan panjang gelombang berikut: 540, 576, 593, nm. Kemudian densitas masing-masing sampel dijumlahkan dan dihitung rasionya. Untuk menghitung persentasi hematin yang terbentuk sebagai *free hematin* digunakan formula berikut:

Persamaan 4.2 Kadar Hematin.

$$\frac{(\text{Parasitized blood ratio}) - (\text{Normal blood ratio})}{(\text{Parasitized blood ratio})} \times 100 = \% \text{ Kadar Hematin}$$

Ket:

Parasitized Blood Ratio: Rata-rata rasio absorbansi darah mencit pada kelompok perlakuan dengan ekstrak atr biji pare.

Normal Blood Ratio: *Rata-rata rasio absorbansi pada darah mencit yang tidak diinfeksi dan tidak mendapat perlakuan.*

% of Total HematinFree: *Persentasi kadar hematin yang terbentuk.*

4.8 Pengolahan dan Analisa Data.

Untuk menganalisa data yang didapatkan digunakan Analisis Sidik Ragam (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 5% ($\alpha = 0,05$). Apabila hasil antar perlakuan berbeda nyata, dengan hasil $F_h > F_t$ maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Signifikan Difference*) untuk melihat perlakuan yang paling bermakna.

BAB 5

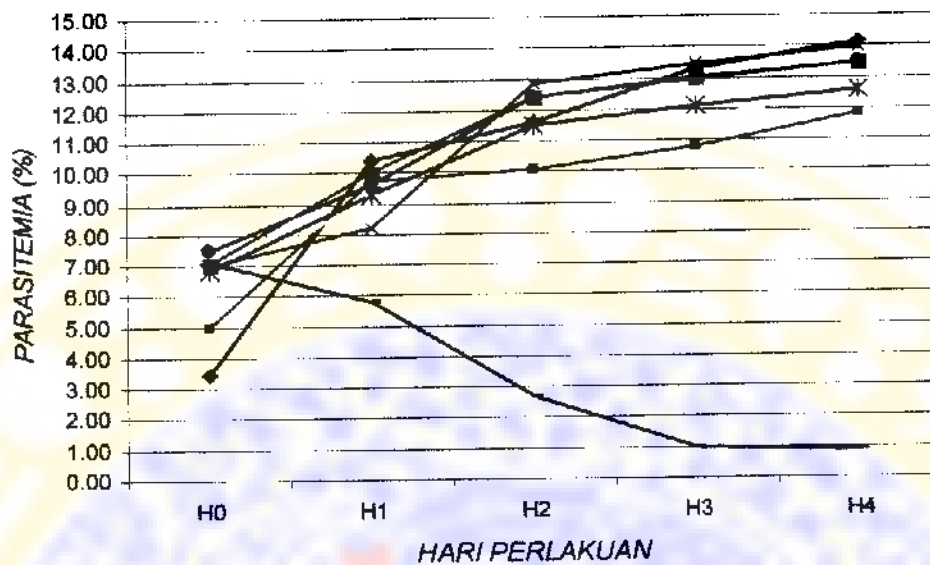
HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Efek ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) terhadap kadar parasitemia mencit yang diinfeksi dengan *P berghei*

Rata-rata persen parasitemia dari mencit yang diberi ekstrak air biji pare dan kontrol diperlihatkan pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.1 : Rata-rata persen parasitemia dari mencit yang diinfeksi dengan *P berghei* yang diberi ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) dan kontrol.

Hari	Parasitemia (%) ($\bar{x} \pm SD$)							
	K-	0.01 mg/kgbb	0.1 mg/kgbb	1 mg/kgbb	10 mg/kgbb	100 mg/kgbb	1000 mg/kgbb	K+
H ₀	3.43 ± 0.95	4.97 ± 1.25	6.03 ± 0.65	6.99 ± 0.15	6.86 ± 0.75	7.48 ± 0.30	7.04 ± 0.41	7.12 ± 0.50
H ₁	10.40 ± 0.27	9.74 ± 0.36	9.35 ± 0.55	8.21 ± 0.26	9.30 ± 0.58	9.62 ± 0.47	9.96 ± 0.04	5.79 ± 0.15
H ₂	11.58 ± 1.09	10.05 ± 0.27	11.12 ± 0.78	12.88 ± 0.35	11.47 ± 0.91	12.4 ± 0.37	12.43 ± 0.57	2.71 ± 0.76
H ₃	13.31 ± 1.14	10.80 ± 0.38	11.79 ± 0.76	13.47 ± 0.35	12.07 ± 0.98	12.99 ± 0.35	13.01 ± 0.52	0.99 ± 0.60
H ₄	14.13 ± 1.12	11.85 ± 0.38	12.37 ± 0.75	13.98 ± 0.32	12.60 ± 0.93	13.47 ± 0.31	13.44 ± 0.14	0.86 ± 1.03



GAMBAR 5.1. Efek ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) terhadap persentasi parasitemia mencit yang diinfeksi dengan *P berghei*. Dosis ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) yang diberikan adalah : 0,01 (■), 0,1 (□), 1 (x), 10 (*), 100(●), 1000 (■) mg/kgbb, kontrol negatif CMCNa 0,5 % 0,2 ml (◆) dan kontrol positif klorokuin 10 mg/kgbb (—).

Pada H_0 (sebelum diberi perlakuan pertama sekali, bertujuan untuk mengetahui parasitemia awal) kadar parasitemia masing-masing kelompok dihitung terlebih dahulu. Uji statistika rerata parasitemia antar kelompok perlakuan pada H_0 didapati perbedaan bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,560$). Parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 100 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 7,47$; $SD = 0,06$; $SE = 0,38$), sedangkan rerata parasitemia terendah dijumpai pada kelompok dosis 0,01 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L*. ($N=3$; $Mean = 6,56$; $SD = 0,41$; $SE = 0,24$) ($p < 0,05$; $SE = 0,560$). Rerata parasitemia antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol juga berbeda nyata (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,595$), dimana rerata parasitemia terendah dijumpai pada kelompok kontrol ($N=3$; $Mean = 3,43$; $SD = 1,5$; $SE = 0,327$).

Pada H_1 (hari pertama perlakuan), uji statistik rerata parasitemia antar kelompok perlakuan didapati perbedaan bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,343$). Parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 1000 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 9,96$; $SD = 0,36$; $SE = 0,20$), sedangkan rerata parasitemia terendah dijumpai pada kelompok dosis 1 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 9,75$; $SD = 0,041$; $SE = 0,024$). Rerata parasitemia antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol juga berbeda nyata (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,329$), dimana rerata parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok kontrol ($N=3$; $Mean = 10,39$; $SD = 0,273$; $SE = 0,157$),

Pada H_2 (hari kedua perlakuan), uji statistik rerata parasitemia antar kelompok perlakuan didapati perbedaan bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,483$). Parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 1 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 12,88$; $SD = 0,91$; $SE = 0,53$), sedangkan rerata parasitemia terendah dijumpai pada kelompok dosis 0,01 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 10,05$; $SD = 0,57$; $SE = 0,33$). Rerata parasitemia antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol juga berbeda nyata (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,560$), dimana rerata parasitemia kelompok kontrol ($N=3$; $Mean = 11,58$; $SD = 1,09$; $SE = 0,63$), lebih tinggi terhadap rerata parasitemia kelompok dosis terendah pada kelompok perlakuan.

Pada H_3 (hari ketiga perlakuan), uji statistik rerata parasitemia antar kelompok perlakuan didapati perbedaan bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,492$). Parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan

dosis 1 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 13,48$; $SD = 0,98$; $SE = 0,57$), sedangkan rerata parasitemia terendah dijumpai pada kelompok dosis 0,01 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 10,8$; $SD = 0,52$; $SE = 0,30$). Rerata parasitemia antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol juga berbeda nyata (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,575$), dimana rerata parasitemia kelompok kontrol ($N=3$; $Mean = 13,31$; $SD = 1,14$; $SE = 0,66$), lebih tinggi terhadap rerata parasitemia kelompok dosis terendah pada kelompok perlakuan.

Pada H_4 (hari keempat perlakuan), uji statistik rerata parasitemia antar kelompok perlakuan didapati perbedaan bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,447$). Parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 1 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 13,97$; $SD = 0,93$; $SE = 0,54$), sedangkan rerata parasitemia terendah dijumpai pada kelompok dosis 0,01 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L* ($N=3$; $Mean = 11,84$; $SD = 0,14$; $SE = 0,08$). Rerata parasitemia antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol juga berbeda nyata (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,539$), dimana rerata parasitemia tertinggi dijumpai pada kelompok kontrol ($N=3$; $Mean = 14,13$; $SD = 1,11$; $SE = 0,65$).

Tabel 5.2 : Rata-rata penghambatan pertumbuhan parasit mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan mendapat perlakuan ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) dan kontrol.

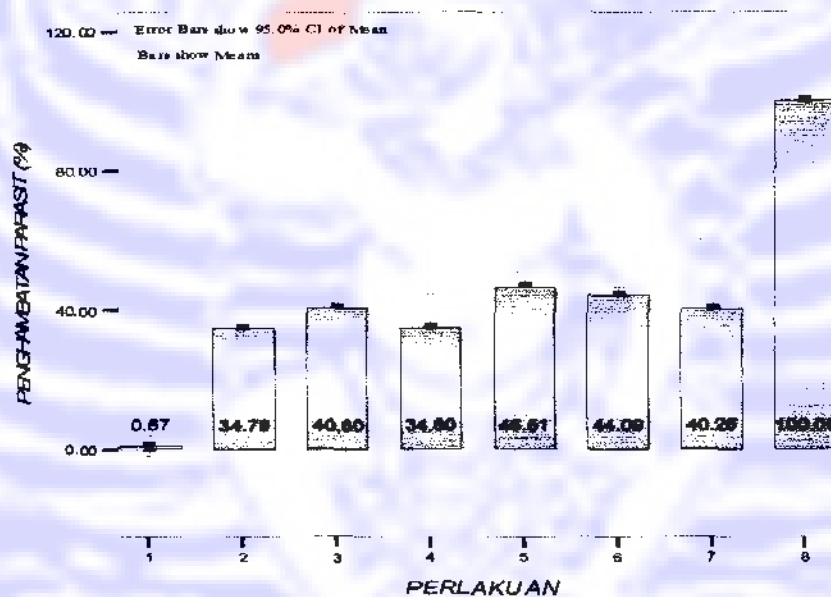
DOSIS (mg/kgbb)	Rata-Rata Penghambatan (%) ($\bar{x} \pm SD$)
K+	100 \pm 0.00 ^a
K-	0.67 \pm 1.166 ^b
0.01	34.80 \pm 2.06 ^c
0.1	40.80 \pm 5.216 ^c
1	34.80 \pm 3.89 ^{c,d}
10	46.51 \pm 1.714 ^d
100	44.09 \pm 0.948 ^d
1000	40.26 \pm 8.155 ^{c,d}

*) super script yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan yang bermakna

Uji statistika rerata pertumbuhan parasit antar kelompok perlakuan berbeda bermakna (Uji Anova, $p < 0,05$; Uji LSD; $p < 0,05$; $SE = 0,095$). Rerata pertumbuhan parasit tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 0,01 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L.* ($N=3$; Mean = 1,75; $SD = 0,56$; $SE = 0,032$), sedangkan rerata pertumbuhan terendah dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgbb ($N = 3$; Mean = 1,43; $SD = 0,09$; $SE = 0,028$). Rerata pertumbuhan parasit antara kelompok perlakuan dengan kontrol berbeda bermakna (Uji Anova, $p < 0,05$; Uji LSD; $p < 0,05$; $SE = 0,089$), dimana rerata pertumbuhan parasit tertinggi dijumpai pada kelompok kontrol ($N=3$; Mean = 2,68; $SD = 0,042$; $SE = 0,041$).

Uji statistika rerata penghambatan pertumbuhan parasit antar kelompok perlakuan berbeda bermakna (Uji Anova, $p < 0,05$; Uji LSD; $p < 0,05$; $SE = 3,59$). Rerata penghambatan pertumbuhan parasit tertinggi dijumpai pada kelompok

perlakuan dosis 10 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L.* ($N=3$; $Mean = 46,5$; $SD = 1,71$; $SE = 0,99$), sedangkan rerata penghambatan pertumbuhan terendah dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 0,01 mg/kgbb ($N = 3$; $Mean = 34,79$; $SD = 2,06$; $SE = 1,19$). Rerata penghambatan pertumbuhan parasit antara kelompok perlakuan dengan kontrol berbeda bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,35$), dimana rerata penghambatan pertumbuhan parasit terendah dijumpai pada kelompok kontrol ($N=3$; $Mean = 0,67$; $SD = 1,17$; $SE = 0,67$).



Gambar 5.2. Efek ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) terhadap penghambatan pertumbuhan parasit terhadap mencit yang diinfeksi dengan *P berghei*. Dosis ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) yang diberikan adalah : 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4), 10 (5), 100 (6), 1000 (7) mg/kgbb, kontrol negatif *CMCNa* 0,5 % 0,2 ml (1) dan kontrol positif klorokuin 10 mg/kgbb (8).

5.2 Efek ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) terhadap kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan *P berghei*

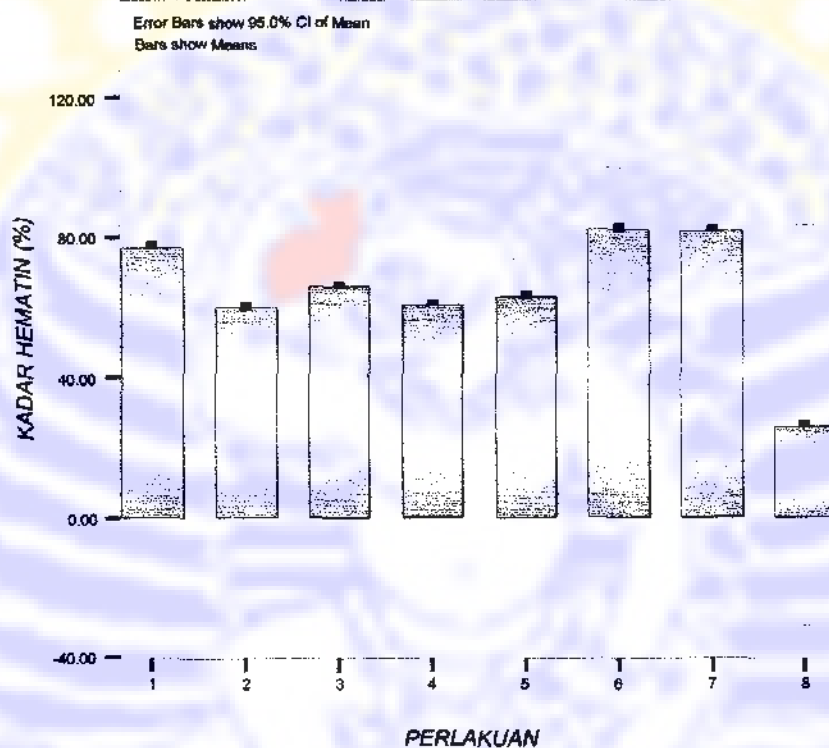
Kadar hematin yang terbentuk didapatkan dari perbandingan rasio absorbansi sampel darah hewan coba yang dilarutkan dalam alkalin alkohol dan aquadestillata yang dibandingkan dengan rasio absorbansi sampel darah mencit normal yang tidak diinfeksi dan tidak mendapat perlakuan. Hasil pengukuran absorbansi pada darah mencit dengan spektrofotometer setelah diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan mendapat perlakuan dengan ekstrak air biji pare terdapat pada lampiran.

Tabel 5.3 : Rata-rata kadar hematin yang terbentuk pada darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan mendapat perlakuan ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) dan kontrol.

DOSIS (mg/kgbb)	Kadar Hematin (%) ($\bar{x} \pm SD$)
K+	25.812 \pm 22.962 ^a
K-	77.351 \pm 6.738 ^b
0.01	59.940 \pm 11.550 ^b
0.1	66.076 \pm 22.733 ^b
1	60.625 \pm 23.710 ^b
10	63.172 \pm 4.272 ^b
100	81.897 \pm 7.096 ^b
1000	81.622 \pm 10.630 ^b

*) *super script yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan yang bermakna*

Uji statistika rerata kadar hematin antar kelompok perlakuan tidak berbeda (*Uji Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 12,44$). Rerata kadar hematin antara kelompok perlakuan dengan kontrol tidak berbeda (*Uji Anova*, $p > 0,05$; *Uji LSD*; $p > 0,05$; $SE = 11,7$).



Gambar 5.3. Efek ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) terhadap kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei*. Dosis ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*) yang diberikan adalah : 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4), 10 (5), 100(6), 1000 (7) mg/kgbb, kontrol negatif CMCNa 0,5 % 0,2 ml (1) dan kontrol positif klorokuin 10 mg/kgbb (8).

5.3 Uji Probit aktivitas antimalaria ekstrak air biji *M charantia L.* terhadap mencit yang diinfeksi dengan *P berghei*

Hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya aktivitas antimalaria diketahui dengan membuat grafik antara dosis dengan persen penghambatan pertumbuhan Plasmodium berghei dan dilakukan Analisa Probit. Hasil Uji Probit dengan program *SPSS 11.5 for Windows*, harga ED_{50} yang diperoleh tidak prospektif. Dimana ED_{50} yang didapatkan jauh diatas 1000 mg/kgbb.

BAB 6

PEMBAHASAN

Malaria tetap menjadi masalah kesehatan utama di dunia. Hal ini disebabkan terjadinya resistensi plasmodium terhadap obat yang ada dan meningkatnya kekebalan vektor nyamuk (*Anopheles*) terhadap insektisida (Gunawan, 2000. Phillipson, 1991). Pada tahun 1955-1939 dikembangkan pembasmian atau eradikasi malaria, setelah ditemukannya khasiat insektisida dari DDT (Muller dan Wresman, 1936-1939).

Bahan alam ini merupakan sumber penting dari berbagai bahan aktif biologik yang potensial dikembangkan sebagai obat antimalaria baru. Pada umumnya bahan aktif biologik dari alam ini lebih aman terhadap mamalia, termasuk manusia. Kesuksesan antimalaria kuinin dan penemuan artemisinin yang poten sebagai antimalaria, dimana kedua obat tersebut berasal dari bahan alam tumbuhan, menjadi faktor pendorong untuk mendapatkan antimalaria baru yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Penelitian dengan pendekatan secara etnofarmakologi merupakan cara terbaik untuk memprediksi tumbuhan yang mempunyai efek antimalaria.

Momordica charantia L. atau yang dikenal sebagai Pare merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria, selain peluruh dahak, obat cacing dan anti diabetes (Hien, 1999. Syamsuhidayat, 1991). Dengan pendekatan etnofarmakologi *Momordica charantia L.* telah digunakan sebagai antimalaria dan mengobati demam di Brazil, Guatemala, Peru, India, Nikaragua, USA, Venezuela, Mexico, dan Indonesia. Bagian yang digunakan

adalah akar, batang, daun, bunga dan buah (Hadi S, 2001. Köhler, 2002. Syamsuhidayat SS, 1991. Taylor L, 2002). Ueno, Doyama, dan Padovani E Salata (1996) di Brazil, meneliti efek antimalaria *in vivo* dari ekstrak etanol batang dan infusian daun *Momordica charantia L.* terhadap mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan kedua ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antimalaria dengan dosis masing-masing 1 gr/kgbb (Taylor L, 2002). Percobaan secara *in vitro* aktivitas antimalaria dari ekstrak lipophilik batang dan daun *Momordica charantia L.* yang dilakukan oleh Köhler *et al* memperlihatkan efek antimalaria dengan IC_{50} 6-25 μ m/ml terhadap *Plasmodium falciparum* (Köhler, 2002).

Bagian tanaman Pare yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji. Karena golongan senyawa dari tumbuhan yang bersifat antimalaria dan mempunyai biopotensi antimalaria antara lain: alkaloid, laktone, terpenoid, xanton dan flavonoid (Saxena, 2003), kandungan senyawa yang terdapat dalam biji *Momordica charantia L.* antara lain resin, triterpen, proteid, lipid, steroid, karbohidrat, alkaloid, glikosida saponin tipe *cucurbitacin* (Taylor L, 2002. Hien, 1999. Syamsuhidayat, 1991). Diduga bahwa biji pare mempunyai efek terhadap parasitemia, penghambatan pertumbuhan plasmodium dan mempengaruhi kadar hematin pada mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

Uji aktivitas malaria dilakukan secara *in vivo* pada mencit menggunakan *Plasmodium berghei* strain ANKA, karena sifat infeksiya yang lebih cepat dan lebih ganas dibandingkan spesies lain yang menyerang rodensia, sehingga apabila ada efek penghambatan, selama 5 hari percobaan perubahan % parasitemia pada tiap harinya akan terlihat lebih jelas dibandingkan spesies yang perkembangannya lambat. Parasit ini terbukti merupakan analog dari malaria pada

manusia dan primata lain dalam beberapa hal aspek esensial seperti struktur, fisiologi, dan siklus hidup (Janse, 2002. Noble dan Noble, 1989).

Metode pengujian yang dilakukan berdasarkan metode *Peter's Test* sehingga bisa didapatkan harga ED_{50} dimana harga ini sebagai salah satu parameter yang penting untuk memutuskan apakah suatu ekstrak tanaman cukup prospektif sebagai antimalaria, dan dengan waktu pengujian yang lebih cepat.

Pemilihan mencit sebagai hewan coba disebabkan parasit malaria yang menginfeksi hewan pengerat, yang salah satunya adalah mencit, telah lama digunakan sebagai model penelitian untuk pengujian antimalaria. Selain pemeliharaan mencit yang mudah, serta harganya yang lebih ekonomis dibandingkan hewan pengerat lainnya menyebabkan mencit sangat sesuai digunakan sebagai hewan coba.

Pada percobaan ini, mencit coba diinokulasi dengan parasit dari darah mencit donor bukan langsung dari simpanan beku parasit yang di-*thawing*, hal ini dimaksudkan untuk memperoleh jumlah parasit yang cukup besar sehingga akan didapat perkembangan parasit yang cukup cepat dalam tubuh mencit coba. Selain itu, pada simpanan beku, terdapat kemungkinan banyak parasit yang mati selama penyimpanan, dan jumlahnya pun bervariasi sehingga menyulitkan penghitungan jumlah parasit yang diinjeksikan ke mencit coba.

Seluruh mencit coba diinfeksi dengan jumlah parasit yang dibuat sama pada setiap mencit. Hal ini dimaksudkan agar mencit coba, mempunyai persen parasitemia yang sama, sehingga kondisi mencit pada awal pengujian dapat diasumsikan sama. Kadar parasitemia awal uji aktivitas malaria dibuat minimal antara 1-5%. Kadar parasitemia ini dimaksudkan agar tidak terjadi kematian

hewan coba yang disebabkan oleh jumlah parasit yang terlalu tinggi.

Pengujian aktivitas antimalaria dilakukan secara *single dose* terhadap tiga macam bahan uji, yaitu larutan kontrol negatif, kontrol positif, dan suspensi ekstrak air biji buah *Momordica charantia.L.* Uji kontrol negatif dilakukan untuk menghindari positif palsu yang ditimbulkan pelarut, dan untuk mengetahui pertumbuhan parasit dalam tubuh mencit tanpa dipengaruhi faktor penghambatan pertumbuhan oleh senyawa yang diduga mempunyai aktivitas antimalaria. Klorokuin difosfat digunakan sebagai kontrol positif karena klorokuin adalah obat standar dalam pengobatan malaria (*drug of choice*), sedangkan pemilihan dosis 10 mg/kgbb karena menurut penelitian Phillipson (1991), pada dosis ini sudah terjadi penghambatan 100% terhadap *P. berghei* strain ANKA.

Melihat data parasitemia seluruh mencit coba pada H0 (parasitemia sebelum diberi perlakuan pertama untuk mengetahui parasitemia awal) terlihat variasi yang cukup besar antar mencit walaupun jumlah dan volume eritrosit yang diinjeksikan sama. Hal ini menandakan adanya perbedaan fisiologis antar mencit yang cukup mempengaruhi pertumbuhan parasit, kemungkinan penyebab perbedaan ini adalah perbedaan sistem imun dan proses absorpsi pada masing-masing mencit. Faktor teknis yang mungkin terjadi adalah kurang sempurnanya penginjeksian seperti kurang dalamnya jarum suntik sehingga darah donor yang disuntikkan terkadang keluar lagi walaupun sedikit yang mungkin akan mempengaruhi jumlah parasit yang masuk kedalam peredaran darah sistemik. Untuk meminimalisasi kesalahan ini, suspensi diinjeksikan dengan kadar yang encer dan volume yang cukup besar (250 μ l), sehingga bila masih ada darah yang keluar waktu penginjeksian, maka diharapkan parasit yang masih ada dalam

suspensi yang diinjeksikan masih cukup banyak untuk memasuki sirkulasi sistemik.

Hasil evaluasi pertumbuhan parasit dari hari pertama perlakuan (H1) sampai hari keempat perlakuan (H4), pertumbuhan parasit antar kelompok perlakuan berbeda bermakna (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,095$) dimana rerata pertumbuhan parasit tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan dosis 0,01 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L.* ($N=3$; $Mean = 1,75$; $SD = 0,56$; $SE = 0,032$). Sementara dibanding dengan kontrol negatif pertumbuhan parasit berbeda bermakna terhadap kelompok perlakuan (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,089$). Ini memperlihatkan bahwa pertumbuhan parasit dihambat oleh ekstrak air biji *M charantia L.*

Dari uji statistika terhadap rerata penghambatan pertumbuhan parasit diketahui bahwa penghambatan tertinggi diperlihatkan oleh kelompok dosis 10 mg/kgbb ekstrak air biji *M charantia L.* ($N=3$; $Mean = 46,5\%$; $SD = 1,71$; $SE = 0,99$). Penghambatan ini berbeda bermakna terhadap kontrol negatif (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 0,089$). Kemudian rerata penghambatan pada kelompok perlakuan di uji statistik dengan kontrol positif. Hasil uji statistika memperlihatkan bahwa daya hambat kelompok perlakuan berbeda nyata (*Uji Anova*, $p < 0,05$; *Uji LSD*; $p < 0,05$; $SE = 3,33$) dengan daya hambat kontrol positif ($N=3$; $Mean = 100$; $SD = 0,0$; $SE = 0,0$). Hasil ini memperlihatkan bahwa ekstrak air biji *M charantia L.* mempunyai aktivitas penghambatan pertumbuhan terhadap parasit *Plasmodium berghei*, tetapi aktivitasnya masih berbeda nyata dengan antimalaria standar.

Hasil uji probit dengan program *SPSS 11.5 for Windows*, harga ED_{50} yang

diperoleh tidak prospektif. Dimana ED_{50} yang didapatkan jauh diatas 1000 mg/kgbb, suatu batas dosis yang ditolerir untuk uji aktivitas antimalaria dari bahan alam (Phillipson, 1991. Fidock DA et al, 2004).

Dari kurva log dosis terhadap probit dapat dilihat model farmakokinetika ekstrak air biji *M charantia L* adalah farmakokinetika non linier atau disebut juga farmakokinetika tergantung dosis. Banyak faktor kemungkinan yang menyebabkan perilaku farmakokinetika non linier ini. Seperti proses absorpsi yang menyebabkan kejenuhan transpor dalam dinding usus, kejenuhan "first pass" metabolisme pada dinding usus atau hepatic; proses distribusi yang menyebabkan terjadinya kejenuhan ikatan protein plasma, kejenuhan transpor masuk dan keluar jaringan; proses eliminasi karena sekresi aktif, kejenuhan ikatan protein plasma; atau eliminasi selain ginjal yang menyebabkan terjadinya metabolisme kapasitas terbatas, penjenruhan enzim dan keterbatasan ko-faktor (Shargel L dan Yu ABC, 1988).

Faktor penting yang diduga sebagai mekanisme penghambatan tumbuhnya parasit adalah proses penghambatan mekanisme "polimerisasi" heme oleh parasit menjadi hematin (Egan TJ, 2004). Trophozoit akan mengambil dan mendegradasi sebagian besar hemoglobin (60-80 %) dalam eritrosit. Parasit ini memerlukan asam amino sebagai sumber protein yang dihasilkan dari degradasi hemoglobin. Selain globin, haem (*ferroprotoporphyrin IX* atau *Fe(II)PPIX*) juga akan dihasilkan selama proses hidrolisis Hb. Melalui proses autooksidasi haem akan diubah menjadi hematin/hematin (*aqua/hydroxoferr-iprotoporphyrin IX* atau *H₂O/HO-Fe(III)PPIX*). Haem ini bersifat toksik terhadap malaria, oleh karena itu untuk mencegah efek toksiknya, parasit akan mendetoksifikasi zat dengan

mekanisme "*heme polymerase*". Hasil detoksifikasi haem bebas ini berupa zat yang insolubel, berbentuk mikrokristal, berwarna coklat gelap yang tersebar didalam *FV* parasit yang dikenal sebagai *hematin (malaria pigment)* (Tripathi and Tekwani, 1999. Egan, 2004).

Kadar hematin yang terbentuk dari proses degradasi hemoglobin, diketahui melalui rasio absorbansi antara alkalin hematin dengan oxyhemoglobin dengan Persamaan 4.3. Absorbansi sampel darah diukur dengan spektrofotometer cahaya tampak pada panjang gelombang 540, 576 dan 593 nm. Darah hewan coba yang dilarutkan dalam aquadestilla akan melepaskan hemoglobin dalam bentuk oxyhemoglobin. Untuk mendapatkan alkalin hematin maka sampel darah dilarutkan dengan alkalin alkoho. Alkalin alkohol ini akan merubah hemoglobin menjadi hematin dan menarik hematin yang telah terbentuk dalam parasit. Rasio ini juga diukur pada mencit normal yang tidak mendapat perlakuan ataupun infeksi, sebagai patokan kadar hematin (Ball, 1948).

Percobaan yang dilakukan memperlihatkan rerata kadar hematin antar kelompok perlakuan tidak berbeda (*Uji Anova, $p > 0,05$; Uji LSD; $p > 0,05$; SE = 12,44*). Rerata kadar hematin antara kelompok perlakuan dengan kontrol tidak berbeda (*Uji Anova, $p > 0,05$; Uji LSD; $p > 0,05$; SE = 11,7*). Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak uji tidak menghambat pembentukan hematin dalam mekanisme efek penghambatan pertumbuhan parasit.

Ada beberapa kemungkinan mekanisme efek penghambatan pertumbuhan parasit oleh ekstrak uji dalam menimbulkan efek antimalaria :

- a. Menghambat enzim dihidrofolat reduktase plasmodia yang bekerja dalam rangkaian reaksi purin, sehingga menyebabkan gagalnya pembelahan inti pada

- pertumbuhan skizon dalam hati (Sukarban 1995, Rosenthal et al 2001).
- b. Mencegah pembentukan asam folinat dari PABA sehingga menghambat pertumbuhan parasit (Sukarban 1995, Rosenthal et al 2001).
 - c. Menghasilkan senyawa endoperoksidase yang akan menghambat sintesis protein parasit (Sukarban 1995, Rosenthal et al 2001, Ridley 2002).
 - d. Menghambat biosintesis protein "*prokaryote-like*" pada organella khusus apicoplast plasmodium (Rosenthal et al 2001, Ridley 2002).
 - e. Menghambat reinvasi eritosit oleh merozoit dengan cara bereaksi dengan lectin dan menginhibisi protease yang dihasilkan merozoit (Tambajong, 2000. Blackman 1998)

Pemilihan metode ekstraksi didasarkan secara etnofarmakologi, dimana penggunaan tumbuhan ini sebagai obat antimalaria dan demam secara tradisional adalah dalam bentuk perasan air. Perasan ini yang diberikan/diminumkan ke penderitanya demam atau malaria. Pada penelitian ini, ekstrak uji diberikan secara peroral sehingga akan mengalami metabolisme terlebih dahulu sebelum diabsorpsi dan didistribusikan ke seluruh tubuh hewan coba. Oleh karena itu belum diketahui apakah potensi antimalaria ekstrak ini berasal dari senyawa aktif atau metabolitnya, sehingga masih diperlukan uji antimalaria *in vitro*. Karena dalam penelitian ini belum bisa ditentukan senyawa yang efektif yang mempunyai efek antimalaria terhadap *Plasmodium berghei*, maka masih diperlukan dilakukan fraksinasi dan/ataupun isolasi terhadap senyawa ekstrak uji terutama pada golongan alkoid dan triterpen yang diduga mempunyai efek penghambatan pertumbuhan plasmodium pada mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia.L*) tidak menurunkan kadar parasitemia mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.
2. Pada dosis 10 dan 100 mg/kgbb mencit ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia.L*) menghambat pertumbuhan *plasmodium* (antiplasmodial) pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.
3. Ekstrak air biji Pare (*Momordica charantia.L*) tidak menurunkan kadar hematin darah mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antimalaria ekstrak ethanol biji *Momordoca charantia.L* terhadap *Plamodium berghei* secara *in-vivo* dan terhadap *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*.
2. Perlu dilakukan penelitian dan isolasi senyawa aktif yang menghambat pertumbuhan *P berghei* dari ekstrak air biji *Momordica charantia.L*.
3. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui mekanisme efek anti-plasmodial dari biji *Momordica charantia*.
4. Perlu dilakukan uji toksisitas akut dan kronik terhadap ekstrak air biji pare (*Momordica charantia L.*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2004. PARE: TANAMAN OBAT INDONESIA. IPTEKnet. http://www.iptek.net.id/ind/cakra_obat/tanamanobat.php?id=92. 7/12/2004 12:55 AM ITZ (GMT+07:00).
- Ball, E G., McJee, R. W., Anfinsen, C.B., Cruz, W.O., and Geiman, Q.M, 1948. Studies on Malarial Parasites IX. Chemical and metabolic Changes During Growth and Multiplication in vivo and vitro. *J.Biol Chem* 175, 547-571.
- Blackman, MJ, 1998. Protease Involved In Erythrocyte Invasion by the Malaria Parasite: Function and Potential as Chemotherapeutic Target. Division of Parasitology, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, U.K
- Bloland, PB, 2001. Drug Resistance in Malaria. World Health Organization.
- Bhat PG, Surolia N, (2001). In vitro antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine in India. *Am. J. Trop. Med.*, 65(4), 2001, pp:304-8.
- Chakraborty S, Bhattacharya S, et al, 2000. Structural and interactional homology of clinically potential trypsin inhibitors: molecular modelling of Cucurbitaceae family peptides using the X-ray structure of MCTI-II. *Protein Engineering* 13(8): 551-555.
- DepKes RI, 1995. Sediaan Umum Farmakope Indonesia, Ed IV, hal: 9
- Devi CU, Valecha N, Atul PK, Pillai CR, 2001. Antiplasmodial effect of three medicinal plants: A preliminary study. *Current science*, Vol. 80, No.8, 25 April 2001 : 917-19
- Egan TJ, 2004. Structure-Function Relationship in chloroquine and Related 4-Aminoquinoline Antimalarials. <http://www.bentham.org/mrmcl-1/egan/egan.htm/> 2/24/2004 12.57 PM ITZ(GMT+07:00).
- Egan TJ, 2004. Haemozoin Formation as a Target for the Rational Design of New Antimalarials. *Drug Design Reviews-Online* 1: 93-110. 2/26/2004.
- Fidock DA, Rosenthal PJ., Croft SL, Brun R, and Nwaka N, 2004. Antimalarial drug discovery:Efficacy models for Compound screening. *Nature Review*. Vol 3, June 2004: 509-520.
- Franssen FFJ, Smeijsters LJJW, Berger I, Beatriz E, Aldana BEM, 1997. In vivo and In vitro antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol

41, No 7, July 1997:1500-1503

- Fryauff DJ, Tuti S, et al, 1998. Chloroquine-Resistant Plasmodium Vivax In Transmigration Settlement of West Kalimantan, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol .59(4): 513-518.
- Gardner MJ, Hall N, et al, 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature Publishing Group. *Nature* Vol. 419: 498-511.
- Guerin P, Nosten F, White NJ, 2001. Malaria : An Essential R&D Agenda. MSF/DND Working Group. *Drugs For Neglected Diseases Working Group*.
- Gunawan S, 2000. Epidemiologi Malaria. Dalam (Harijanto PN, ed). *Malaria: Epidemiologi, patogenesis, Manifestasi klinis, & Penanganan*. Jakarta. EGC, hal: 1-13.
- Hadi S, Bremmer JB, 2001. Initial Studies on Alkaloid from Lombok Medicinal Plants. *Molecules* 6:117-129.
- Hamato N, Koshiha T, Pham TN, Tatsumi Y, Nakamura D, Takano R, Hayashi K, Hong YM, Hara S, 1991. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* LINN.) seeds: purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. *FEBS Lett*, 1991 Jun 24, Vol 284(2) : 161-4.
- Hanspal M, Dua M, Takakuwa Y, Chishti AH, and Mizuno A, 2002. Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood*, 1 Aug 2002. Vol 100, No 3:1048-1054
- Harijanto PN edt, 2000. *Malaria : Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis, & Penanganan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Hayashi K, Takehisa T, Hamato N, Takano R, Hara S, Miyata T, Kato H, 1994. Inhibition of serine proteases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. *J Biochem, Tokyo*, 1994, Nov, Vol:116(5) : 1013-18
- Hien NH, Widodo SH, 1999. *Momordica L.* In (de Padua LS, Bunyapraphatsara N, Lemmens RHM, eds). *Plant Resources of South-East Asia : Medicinal and poisonous plants* 1. No 12(1). PROSEA, Bogor, Indonesia, pp 353-359.
- Hillpert K, Wessner H, et al, 2003. Design and Characterization of Hybrid Miniprotein That Specifically Inhibits Porcine Pancreatic Elastase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278: 24986-24993.

- Ignatushchenko MV, Winter RW, Baëchinger HP, Hinrichs DJ, Riscoe MK, 1997. Xanthones as antimalarial agents; studies of a possible mode of action. *FEBS Letters* 409 : 67-73
- Janse C., Waters A., 2002. The plasmodium berghei research model of malaria. Leiden University Medical Centre, Parasitology-Malaria. <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model04.html> (last update: 2002-07-19). 5/12/2004 11:14 AM ITZ (GMT+07:00).
- Köhler, I et al, 2002. Antiplasmodial Compunds from *Calea tenuifolia*: In vitro Antiplasmodial Investigation of Medical Plants from El Salvador; *Z. Naturforsch.* 57c: 277-281.
- Laihad FJ, Gunawan S, 2000. Malaria di Indonesia. Dalam (Harijanto PN, ed). *Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi klinis, & Penanganan*. Jakarta. EGC, hlm17-24.
- Luthra PM., Luthra R, 2003. Sequencing of the malarial parasite genome reveals potential drug targets to combat malaria. *Current science*, Vol. 84, No. 5, 10-March-2003 : 623-625.
- Leluk J, 2000. Serine Proteinase Inhibitor Family In Squash Seeds: Mutational Variability Mechanism And Correlation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Vol. 5. No. 1. 2000 : 91-106
- Martiney JA., Cerami A., and Slater AFG, 1995. Verapamil Reversal of Chloroquine Resistance in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Is Specific for Resistant Parasites and Independent of the Weak Base Effect. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270, No. 38, Sep 22: 22393-8.
- Menezes CMS, Kirchgatter K, Santi SMD, Savalli C, 2002. In vitro Chloroquine resistance modulation study on fresh isolates of Brazilian *Plasmodium falciparum*: Intrinsic antimalarial activity of Phenothiazine drug. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol.97(7): 1033-1039.
- Nazir M, 1985. *Metode Penelitian*. Ghalia Indonesia, Jakarta
- Noble ER dan Noble GA, 1989. *Parasitologi: Biologi Parasit Hewan*. Terjemahan: Wardianto, Soeripto N (ed), ed 5, Gadjah Mada University Press, hlm 231-232.
- Oduola AMJ, Sowunmi A, et al, 1998. In Vitro and In Vivo Reversal of Chloroquine Resistance *Plasmodium falciparum* with Prometazine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(5): 625-629.
- Ogata F, Miyata T, et al, 1991. Purification and Amino Acid Sequence of Bitter Gourd Inhibitor against an Acidic-specific Endopeptidase of *Streptomyces griseus*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.266: 16715-16721.

- Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL, Chauhan VS (1999). Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 27, Issue of July 2 : 19383–19388
- Pandey AV, Bisht H, et al, 2001. Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem. J.* : 355: 333-338.
- Phillipson, JD., 1991. Assays for Antimalarial and Amoebicidal Activities. In "Methods in Plant Chemistry" (Hostettmann., ed). Academic Press, London, pp 135-152
- Rang HP, Ritter JM, Dale MM, 1995. Pharmacology, 3rd edition, Churchill Livingstone, pp 761-775.
- Rochiman K, 1989. Dasar rancangan percobaan dan rancangan acak lengkap. Universitas Airlangga, hlm 20-27.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, And Deshpande VV, 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, Sept. 1998, Vol. 62, No. 3: 597–635.
- Rawling ND, Tolle DP, Barret AJ, 2004. Evolutionary Families of Peptidase Inhibitor. *Biochemical Journal Immediate Publication*. Biochemical Society.
- Ridley RG, 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for anti-malarial drug. *Nature*. Vol.415: 686-693
- Rosenthal PJ, 1998. Protease of Malaria Parasites: New Target for Chemotherapy. *Emerging Infectious Disease*. Vol. 4. No. 1: 49-57.
- Rosenthal PJ, 2003. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *The Journal of Experimental Biology* 206: 3735-3744.
- Rosenthal PJ, Goldsmith RS, 2001. Antiprotozoal drugs. In "Basic and clinical pharmacology" (Katzung BG, ed), eight edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, USA, pp 882-902.
- Saunders-Dawson B, Trapp RG, 1994. Basic & clinical biostatistics. 2nd ed. a Lange Medical Book, Prentice-Hall International Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, pp 99-124.
- Saxena S, Pant N, Jain D C, Bhakuni R S, 2003. Antimalarial agents from plant sources. *Current Science*, Vol. 85, No. 9, 10 November 2003 :1314-29
- Shargel L dan Yu ABC, 1988. Biofarmasetika dan farmakokinetika terapan. Penerjemah: Fasich dan Sjamsiah S. Airlangga University Press, Surabaya, hlm 323-354

- Stell Robert GD, 1991. Prinsip dan Prosedur statistika: suatu pendekatan biometrik; alih bahasa, Bambang Sumantri, ed.2, Cet. 2, Jakarta, Gramedia Pustaka Utama, hlm 135-140
- Sukarban S, Zunilda SB, 1995. Obat Anti Malaria. Dalam (Ganiswarna SG, editor utama). Farmakologi dan Terapi, edisi 4, cetakan ulang 2002. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm545-559.
- Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, et al, 1996. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.93: 11865-70.
- Syamsuhidayat SS, Hutapea JR, 1991. Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Departemen Kesehatan RI, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hlm 388-389.
- Tambajong EH, 2000. Patobiologi malaria. Dalam "Malaria : Epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, & penanganan. (Harijanto PN, ed). Jakarta. EGC, hal 54-96.
- Tamta H, Mukhopadhyay AK, 2003. Biochemical targets for malaria chemotherapy. CRIPS Vol.4: 6-9.
- Taylor L, 2002. Technical Data Report for Bitter Melon. In Herbal Secrets of the Rainforest, 2nd edition, Sage Press, Inc.
- Tjitra E, 2000. Obat anti malaria. Dalam "Malaria: Epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, & penanganan" (Harijanto PN, ed).. Jakarta. EGC, hal 194-216
- Tripathi A.K, and Tekwani B.L, 1999. Mechanism of formation of β -hematin in malaria parasite: lipids edge over proteins as possible mediators. Journal of Parasitic Diseases. Vol. 23, Dec 1999 : 61-70
- Trujilo SB, Lora LL, Fonseca, 1998. Resistance of Plasmodium falciparum to Antimalarial Drugs in Zaragoza (Antioquia, Colombia), 1998. Mem Inst Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(3) : 401-406.
- WHO, 2000. Management of severe malaria : a practical handbook, 2nd ed., Geneve, pp V-VIII.



LAMPIRAN

Lampiran 1

Uraian Tentang Jadwal Kegiatan

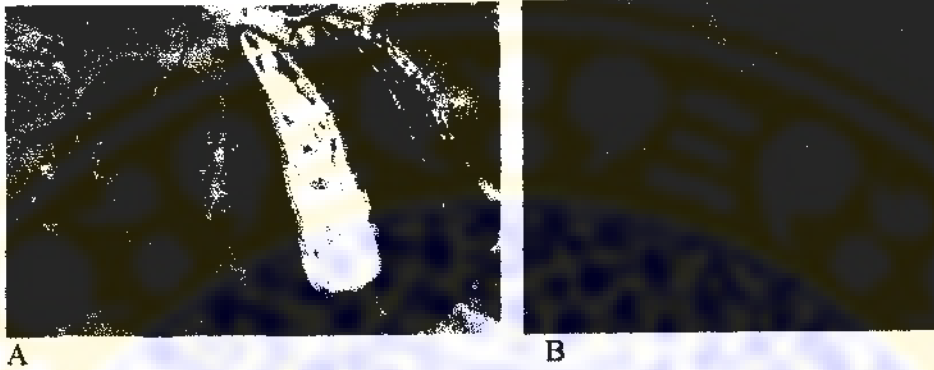
NO	KEGIATAN	MINGGU KE-											
		I	VIII	XII	XVI	XX	XXII	XXIV	XXVIII	XXX	XXXII	XXXIV	
1	Studi Kepustakaan	■	■	■	■								
2	Pengajuan Usul Penelitian		■	■									
3	Eksplorasi Penelitian			■									
4	Persiapan Penelitian				■								
5	Pengumpulan Bahan dan Materi				■	■							
6	Petaksanaan Penelitian				■	■							
7	Evaluasi Hasil Penelitian		■	■		■							
8	Analisa Hasil Penelitian						■	■	■				
9	Penyusunan Laporan							■	■	■	■		
10	Seminar Hasil Penelitian										■	■	
11	Revisi											■	
12	Arsip												■

Lampiran 2

Biaya Satuan Penelitian

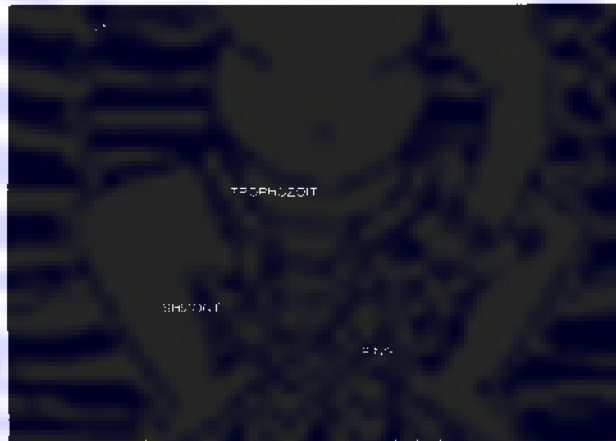
1. Honorarium			
a. Tenaga Laboran/Teknisi	:	Rp	1 500 000,00
b. Tenaga Administrasi	:	Rp	500 000,00
2. Bahan dan peralatan penelitian			
a. Bahan habis pakai	:	Rp	3 500 000,00
b. Alat	:	Rp	1 500 000,00
c. Sewa alat	:	Rp	750 000,00
3. Perjalanan			
a. Biaya perjalanan	:	Rp	1 200 000,00
b. Transportasi lokal	:	Rp	500 000,00
4. Laporan Penelitian			
a. Penggandaan	:	Rp	500 000,00
5. Seminar			
a. Konsumsi	:	Rp	600 000,00
b. Biaya penyelenggaraan	:	Rp	450 000,00
Total	:	Rp	11 000 000,00

Lampiran 3

Gambar Buah dan Biji Pare (*Momordica charantia* L.)

Gambar buah Pare (*Momordica charantia* L.) (A) yang muda (kanan) dan yang matang (kiri) dan biji Pare (B). (DOK. PRIBADI).

Lampiran 4 Gambar hapusan darah tipis mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan mendapat perlakuan dengan ekstrak air Biji Pare (*Momordica charantia* L.)



Bentuk ring, trophozoite dan schizont *P. berghei* pada mencit dengan pewarnaan Giemsa 10 %.
(DOK. PRIBADI)

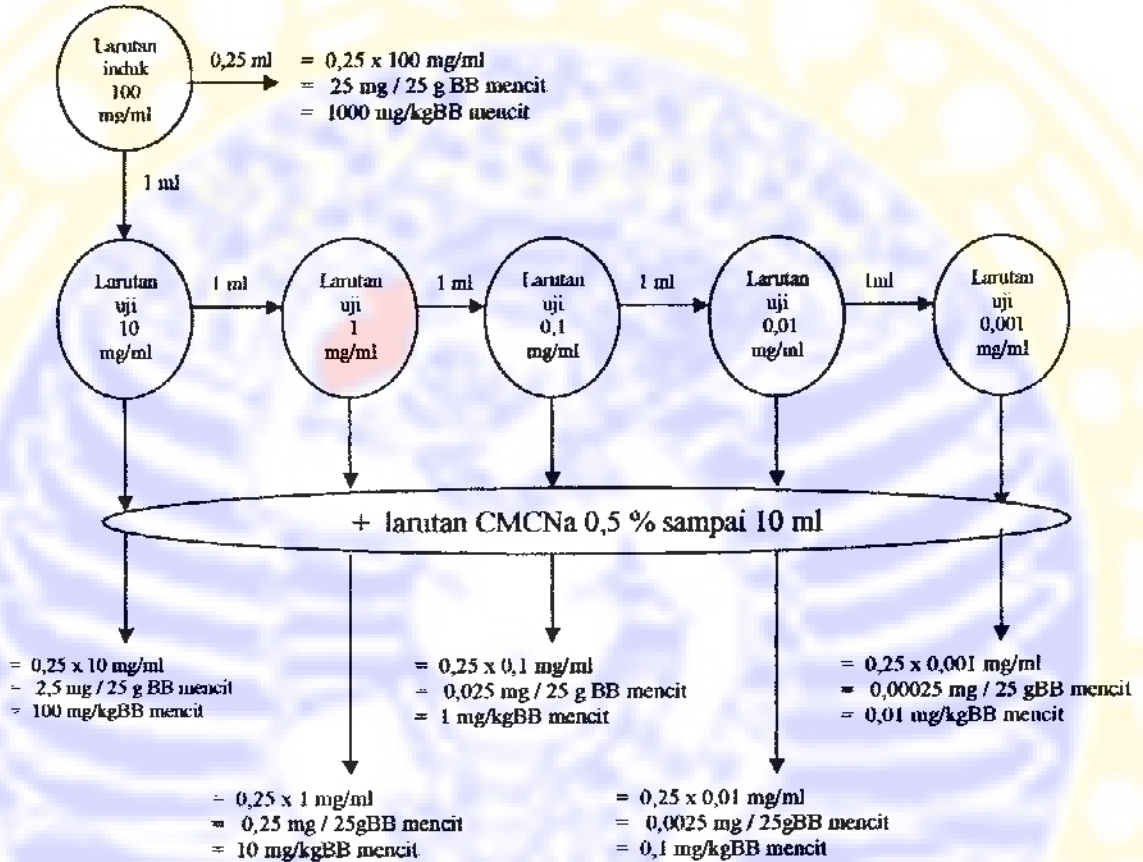
Lampiran

Lampiran 5

Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji.

1000 mg ekstrak uji + larutan CMCNa 0,5 % sampai 10 ml \approx 100 mg/ml.

Volume suspensi yang diberikan = 250 μ l/25 g BB mencit.



Lampiran 6

Volume Suspensi Ekstrak Uji Yang di Sondakan.

Berdasarkan berat badan mencit, dihitung volume larutan uji yang diberikan pada mencit. Contoh perhitungannya sebagai berikut :

Larutan ekstrak uji 1000 mg/kg BB:

1. Mencit 1 = 23 g ; Volume suspensi yang diberi = $23 \text{ g} \times 250 \mu\text{l}/25 \text{ g} = 230 \mu\text{l}$.
2. Mencit 2 = 26 g ; Volume suspensi yang diberi = $26 \text{ g} \times 250 \mu\text{l}/25 \text{ g} = 260 \mu\text{l}$.
3. Mencit 3 = 28 g ; Volume suspensi yang diberi = $28 \text{ g} \times 250 \mu\text{l}/25 \text{ g} = 280 \mu\text{l}$.

Lampiran 7

Penghitungan Persen Parasitemia.

Contoh penghitungan persen parasitemia

Untuk menghitung persen parasitemia digunakan sebagai berikut :

$\% \text{ parasitemia} = (\text{jumlah eritrosit yang terinfeksi} \times 1000 \text{ eritrosit}) / 100 \%$.

Mis : jumlah eritrosit yang terinfeksi tiap 1000 eritrosit = 37

$$\begin{aligned} \% \text{ parasitemia} &= (37/1000) \times 100 \% \\ &= \underline{3,7 \%} \end{aligned}$$

Lampiran 8

Penghitungan Pertumbuhan Parasit.

Untuk mendapatkan harga pertumbuhan, digunakan persamaa berikut:

$$\% \text{ pertumbuhan} = \frac{P(d_1 - d_0) + P(d_2 - d_1) + \dots + P(d_x - d_{x-1})}{\text{jumlah hari} - 1}$$

$P(d_x - d_{x-1}) = \% \text{ parasitemia hari } x \text{ dikurangi } \% \text{ parasitemia hari sebelumnya.}$

Apabila terjadi penurunan $\% \text{ parasitemia}$ ($P(d_x - d_{x-1}) = \text{negatif}$), maka pertumbuhan dianggap nol.

Contoh perhitungan sebagai berikut :

Data parasitemia dosis 1000 mg/kg BB hari ke-1 (D_0) sampai hari ke-5 (D_4):

Mencit 1 : $D_0 = 7.04$; $D_1 = 9.96$; $D_2 = 12.43$; $D_3 = 13.01$; $D_4 = 13.44$.

$$\begin{aligned} \% \text{ Pertumbuhan} &= \frac{(9.96 - 7.04) + (12.43 - 9.96) + (13.01 - 12.43) + (13.44 - 13.01)}{4} \\ &= \frac{2.92 + 2.47 + 0.58 + 0.43}{4} \\ &= 6.4 / 4 \\ &= \underline{1.6 \%} \end{aligned}$$

Lampiran 9

Penghitungan Aktivitas Antimalaria Ekstrak Uji.

Untuk mencari Aktivitas antimalaria ekstrak bahan uji = penghambatan pertumbuhan parasit.

$$\text{Activity} = 100 \% - \left\{ \frac{\text{mean parasitemia treated}}{\text{mean parasitemia control}} \times 100 \right\}.$$

$$\approx \% \text{ penghambatan} = 100 \% - \left\{ \frac{\text{rata pertumbuhan parasit pada kelompok perlakuan}}{\text{rata pertumbuhan parasit pada kontrol negatif}} \times 100 \right\}.$$

Contoh :

$$\% \text{ pertumbuhan pada dosis } 1000 \text{ mg/kgbb} = 1.6 \%$$

$$\% \text{ pertumbuhan pada kontrol negatif} = 2.68\%$$

maka % penghambatan dosis 1000 mg/kgbb adalah :

$$= 100 \% - \left\{ \left(\frac{1.6}{2.68} \right) \times 100 \right\}$$

$$= 100 \% - (0.597 \times 100)$$

$$= 100 \% - 59.7$$

$$= \underline{40.3 \%}.$$

Lampiran 10

Penghitungan Absorbansi Darah Hewan Coba.

Rasio absorbansi darah hewan coba didapatkan dengan persamaan berikut.

$$\begin{aligned}
 R &= R_1 / R_2 \\
 R_1 &= A_{1.1} + A_{1.2} + A_{1.3} \\
 R_2 &= A_{2.1} + A_{2.2} + A_{2.3} \\
 A_{1.1} &= \text{Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam alkalin alkohol pada panjang gelombang 540 nm} \\
 A_{1.2} &= \text{Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam alkalin alkohol pada panjang gelombang 576 nm} \\
 A_{1.3} &= \text{Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam alkalin alkohol pada panjang gelombang 593 nm} \\
 A_{2.1} &= \text{Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam aquadestillata pada panjang gelombang 540 nm} \\
 A_{2.2} &= \text{Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam aquadestillata pada panjang gelombang 576 nm} \\
 A_{2.3} &= \text{Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam aquadestillata pada panjang gelombang 593 nm} \\
 R_1 &= \text{Jumlah total absorbansi Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam alkalin alkohol} \\
 R_2 &= \text{Jumlah total absorbansi Absorbansi darah mencit yang dilarutkan dalam aquadestillata}
 \end{aligned}$$

Contoh perhitungan:

Absorbansi darah mencit 1 pada dosis 1000 mg/kgbb :

$$\begin{aligned}
 - \text{ Alkalin alkohol} &= 0.074; 0.073; 0.06 \\
 - \text{ Aquadestillata} &= 0.298; 0.245; 0.101
 \end{aligned}$$

Maka :

$$\begin{aligned}
 R_1 &= 0.074 + 0.073 + 0.06 &= 0.207 \\
 R_2 &= 0.298 + 0.245 + 0.101 &= 0.644 \\
 R &= 0.207 / 0.644 \\
 &= 0.321429
 \end{aligned}$$

$$\text{Rasio absorbansi darah mencit 1} = \underline{0.321429}$$

Lampiran 11

Penghitungan Kadar Hematin

Kadar hematin (*% total free hematin*) didapatkan melalui perhitungan :

$$\% \text{ of total hematin Free} = \frac{(\text{PBR} - \text{NBR}) \times 100}{\text{PBR}}$$

PBR = *Parasitized Blood Ratio*
Rata-rata rasio absorbansi darah mencit pada kelompok perlakuan dengan ekstrak air biji pare

NBR = *Normal Blood Ratio*
Rata-rata Rasio absorbansi darah mencit pada kelompok yang tidak diinfeksi dan tidak mendapat perlakuan.

Contoh perhitungan :

$$\text{Rata-rata rasio absorbansi pada dosis } 1000 \text{ mg/kgbb} = 0.21$$

$$\text{Rata-rata rasio absorbansi pada mencit normal} = 0.03$$

Maka :

$$\begin{aligned} \text{Kadar hematin} &= \frac{(0.21 - 0.03) \times 100}{0.21} \\ &= \underline{81.622 \%} \end{aligned}$$

Lampiran 12 :

Kadar Parasitemia dari Mencit yang Diberi Ekstrak Air Biji Pare dan Kontrol.

DOSIS mg/kgbb	PARASITEMIA (%)										
	Rep	H0		H1		H2		H3		H4	
		eri (+)	%	eri (+)	%	eri (+)	%	eri (+)	%	eri (+)	%
1000 (P1)	1	77	5.60	134	10.35	157	12.14	142	12.59	164	13.01
	2	124	7.79	108	9.65	175	12.68	158	13.31	169	13.71
	3	88	7.73	131	9.87	142	12.48	160	13.14	167	13.62
100 (P2)	1	83	6.78	122	10.26	137	11.58	142	12.18	161	12.66
	2	135	8.08	117	9.32	159	13.13	183	13.68	172	14.14
	3	97	7.56	105	9.28	154	12.57	156	13.11	162	13.61
10 (P3)	1	83	6.86	124	9.59	163	11.36	134	11.98	142	12.52
	2	91	7.01	101	9.08	162	11.86	160	12.46	159	12.95
	3	77	6.72	108	9.24	129	11.18	144	11.79	147	12.32
1 (P4)	1	101	6.86	111	8.67	157	12.27	144	12.85	165	13.37
	2	109	7.79	117	8.39	225	13.93	191	14.60	183	15.05
	3	74	6.30	88	7.56	141	12.45	162	12.98	152	13.50
0.1 (P5)	1	64	5.68	107	9.14	142	11.37	151	12.01	163	12.58
	2	74	6.24	114	9.02	127	10.69	139	11.39	146	12.02
	3	93	6.15	128	9.89	142	11.30	135	11.98	147	12.51
0.01(P6)	1	63	4.53	132	9.70	135	10.47	142	11.19	143	11.75
	2	63	5.04	129	9.78	120	10.28	130	11.00	123	12.00
	3	61	5.34	133	9.76	119	9.41	119	10.21	136	11.78
K-	1	53	4.09	135	10.32	156	12.84	157	14.05	188	14.91
	2	53	3.86	146	10.17	151	10.91	175	13.89	182	14.64
	3	35	2.35	132	10.70	131	10.99	148	12.00	145	12.85
K+	1	87	6.72	71	5.78	24	2.02	19	1.68	16	1.42
	2	77	6.95	67	5.65	31	2.57	6	0.54	4	0.31
	3	104	7.68	68	5.95	42	3.53	9	0.76	10	0.84

Ket:

H_{1-4} = Hari Perlakuan
 H_0 = Kadar Parasitemia awal
 K- = Kontrol negatif
 K+ = Kontrol Positif
 Rep = Replikasi

Lampiran 13 Rekapitulasi Data Absorbansi Darah Hewan Coba

Kel	Rep	ABSORBANSI			TOTAL	R1/R2	
		Sampel	λ540	λ576			λ593
P1	1	R1	0.074	0.073	0.06	0.207	0.321
		R2	0.298	0.245	0.101	0.644	
	2	R1	0.064	0.058	0.057	0.179	0.203
		R2	0.389	0.337	0.156	0.882	
	3	R1	0.054	0.05	0.05	0.154	0.103
		R2	0.704	0.595	0.202	1.501	
P2	1	R1	0.062	0.063	0.065	0.19	0.121
		R2	0.728	0.639	0.198	1.565	
	2	R1	0.062	0.066	0.07	0.198	0.272
		R2	0.338	0.282	0.108	0.728	
	3	R1	0.07	0.069	0.069	0.208	0.178
		R2	0.578	0.408	0.18	1.166	
P3	1	R1	0.068	0.062	0.06	0.19	0.079
		R2	1.14	0.966	0.306	2.412	
	2	R1	0.081	0.083	0.085	0.249	0.097
		R2	1.19	1.052	0.32	2.562	
	3	R1	0.066	0.065	0.064	0.195	0.079
		R2	1.124	0.979	0.365	2.468	
P4	1	R1	0.048	0.051	0.052	0.151	0.052
		R2	1.319	1.269	0.302	2.89	
	2	R1	0.067	0.069	0.075	0.211	0.235
		R2	0.419	0.351	0.126	0.896	
	3	R1	0.048	0.045	0.046	0.139	0.068
		R2	0.955	0.838	0.253	2.046	
P5	1	R1	0.049	0.047	0.048	0.144	0.055
		R2	1.209	1.142	0.288	2.639	
	2	R1	0.06	0.056	0.055	0.171	0.273
		R2	0.292	0.235	0.099	0.626	
	3	R1	0.064	0.062	0.064	0.19	0.092
		R2	0.96	0.851	0.249	2.06	
P6	1	R1	0.042	0.04	0.039	0.121	0.065
		R2	0.853	0.797	0.204	1.854	
	2	R1	0.055	0.054	0.056	0.165	0.116
		R2	0.66	0.592	0.172	1.424	
	3	R1	0.058	0.055	0.055	0.168	0.067
		R2	1.149	1.058	0.282	2.489	
K-	1	R1	0.075	0.08	0.083	0.238	0.125
		R2	0.892	0.771	0.245	1.908	
	2	R1	0.067	0.067	0.068	0.202	0.205
		R2	0.076	0.652	0.255	0.983	
	3	R1	0.073	0.074	0.077	0.224	0.111
		R2	0.942	0.838	0.244	2.024	
K+	1	R1	0.075	0.08	0.083	0.238	0.125
		R2	0.892	0.771	0.245	1.908	
	2	R1	0.067	0.067	0.068	0.202	0.205
		R2	0.076	0.652	0.255	0.983	
	3	R1	0.073	0.074	0.077	0.224	0.111
		R2	0.942	0.838	0.244	2.024	
N	1	R1	0.040	0.034	0.029	0.103	0.043
		R2	1.066	1.105	0.222	2.393	
	2	R1	0.054	0.041	0.032	0.127	0.026
		R2	1.749	1.785	1.344	4.878	
	3	R1	0.056	0.043	0.034	0.133	0.025
		R2	2.409	2.3427	0.507	5.2587	

Keterangan:

- R_1 : Absorbansi sampel darah dalam larutan alkalin alkohol
 R_2 : Absorbansi sampel darah dalam larutan aquadestillata
 P_{1-6} : Kelompok perlakuan
 K^+ : Kontrol positif; K^- : Kontrol negatif
 Rep : Replikasi; N : Kelompok tanpa infeksi dan perlakuan
 R_1/R_2 : Rasio total absorbansi R_1 terhadap R_2

Lampiran 14

Compare Means Pertumbuhan Parasit

Notes

Input	Data	DATA Eksperiment.sav
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	24
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY tumbuh BY dosis /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = LSD ALPHA(.05).
Resources	Elapsed Time	0:00:00.03

Descriptives

PERTUMBUHAN PARASIT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1000 MG/KGBB	3	1.6000	.21856	.12503	1.0820	2.1380	1.47	1.85
100 MG/KGBB	3	1.4967	.02309	.01333	1.4393	1.5540	1.47	1.51
10 MG/KGBB	3	1.4333	.04933	.02848	1.3108	1.5559	1.40	1.49
1 MG/KGBB	3	1.7467	.10116	.05840	1.4954	1.9980	1.63	1.81
0.1MG/KGBB	3	1.5867	.13503	.07796	1.2512	1.9221	1.45	1.72
0.01MG/KGBB	3	1.7500	.05568	.03215	1.6117	1.8883	1.70	1.81
K-	3	2.6767	.04163	.02404	2.5732	2.7801	2.63	2.71
K+	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	24	1.5362	.70832	.14418	1.2380	1.8345	.00	2.71

Test of Homogeneity of Variances

PERTUMBUHAN PARASIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.009	7	16	.004

ANOVA**PERTUMBUHAN PARASIT**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.308	7	1.615	155.392	.000
Within Groups	.166	16	.010		
Total	11.474	23			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: PERTUMBUHAN PARASIT

LSD

(I) DOSIS PERLAKUAN	(J) DOSIS PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	1000 MG/KGBB	1.0767(*)	.08325	.000	.9002	1.2531
	100 MG/KGBB	1.1800(*)	.08325	.000	1.0035	1.3565
	10 MG/KGBB	1.2433(*)	.08325	.000	1.0669	1.4198
	1 MG/KGBB	.9300(*)	.08325	.000	.7535	1.1065
	0.1MG/KGBB	1.0900(*)	.08325	.000	.9135	1.2665
	0.01MG/KGBB	.9267(*)	.08325	.000	.7502	1.1031
	K+	2.6767(*)	.08325	.000	2.5002	2.8531

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

Lampiran 15

Compare Means Penghambatan Pertumbuhan Parasit

Notes

Input	Data	C:\Documents and Settings\MARIHOTM\My Documents\PENELITIAN\PENELITIAN\DATA EKSPERIMENTAL\DATA Ekspiriment.sav
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	24
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY hambatan BY dosis /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = LSD ALPHA(.05).	
Resources	Elapsed Time	0:00:00.11

Descriptives

PENGHAMBATAN PARASIT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1000 MG/KGBB	3	40.2600	8.11534	4.68539	20.1004	60.4196	30.69	45.05
100 MG/KGBB	3	44.0867	.94817	.54743	41.7313	46.4421	43.49	45.18
10 MG/KGBB	3	48.5067	1.71360	.98935	42.2498	50.7635	44.55	47.74
1 MG/KGBB	3	34.7987	3.89241	2.24728	25.1274	44.4650	32.28	39.28
0.1 MG/KGBB	3	40.7967	5.21634	3.01166	27.8386	53.7548	35.65	46.08
0.01 MG/KGBB	3	34.7933	2.05525	1.18660	29.6878	39.8988	32.63	36.72
K-	3	.6733	1.18625	.67333	-2.2238	3.5705	.00	2.02
K+	3	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
Total	24	42.7392	26.24031	5.35628	31.6589	53.8195	.00	100.00

Test of Homogeneity of Variances

PENGHAMBATAN PARASIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.084	7	16	.003

ANOVA**PENGHAMBATAN PARASIT**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15601.459	7	2228.780	151.567	.000
Within Groups	235.279	16	14.705		
Total	15836.738	23			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: PENGHAMBATAN PARASIT

LSD

(I) DOSIS PERLAKUAN	(J) DOSIS PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	1000 MG/KGBB	-39.5867(*)	3.13102	.000	-46.2241	-32.9492
	100 MG/KGBB	-43.4133(*)	3.13102	.000	-50.0508	-36.7759
	10 MG/KGBB	-45.8333(*)	3.13102	.000	-52.4708	-39.1959
	1 MG/KGBB	-34.1233(*)	3.13102	.000	-40.7608	-27.4859
	0.1MG/KGBB	-40.1233(*)	3.13102	.000	-46.7608	-33.4859
	0.01MG/KGBB	-34.1200(*)	3.13102	.000	-40.7575	-27.4825
	K+	-99.3267(*)	3.13102	.000	-105.9641	-92.6892
K+	1000 MG/KGBB	59.7400(*)	3.13102	.000	53.1025	66.3775
	100 MG/KGBB	55.9133(*)	3.13102	.000	49.2759	62.5508
	10 MG/KGBB	53.4933(*)	3.13102	.000	46.8559	60.1308
	1 MG/KGBB	65.2033(*)	3.13102	.000	58.5658	71.8408
	0.1MG/KGBB	59.2033(*)	3.13102	.000	52.5659	65.8408
	0.01MG/KGBB	65.2067(*)	3.13102	.000	58.5692	71.8441
	K-	99.3267(*)	3.13102	.000	92.6892	105.9641

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

Lampiran 16

Compare Means Rasio Absorbansi Sampel Darah

Notes

Input	Data	C:\Documents and Settings\MARIHOT\My Documents\PENELITIAN\PENELITIAN\DATA EKSPERIMENTAL\DATA Eksperimen.sav
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	24
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY abarban BY dosis /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = LSD ALPHA(.05).	
Resources	Elapsed Time	0:00:00.03

Descriptives

RASIO ABSORBANSI

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1000 MG/KGBB	3	.2090	.10912	.06300	-.0621	.4801	.10	.32
100 MG/KGBB	3	.1903	.07625	.04402	.0009	.3798	.12	.27
10 MG/KGBB	3	.0850	.01039	.00600	.0592	.1108	.08	.10
1 MG/KGBB	3	.1183	.10135	.05852	-.1334	.3701	.05	.24
0.1MG/KGBB	3	.1400	.11666	.06735	-.1498	.4298	.06	.27
0.01MG/KGBB	3	.0827	.02888	.01668	.0109	.1544	.07	.12
K-	3	.1470	.05071	.02928	.0210	.2730	.11	.21
K+	3	.0453	.01629	.00940	.0049	.0858	.03	.06
Total	24	.1272	.08238	.01682	.0924	.1620	.03	.32

Test of Homogeneity of Variances

RASIO ABSORBANSI

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.819	7	16	.041

ANOVA**RASIO ABSORBANSI**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.065	7	.009	1.645	.193
Within Groups	.091	16	.006		
Total	.156	23			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: RASIO ABSORBANSI

LSD

(I) DOSIS PERLAKUAN	(J) DOSIS PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	1000 MG/KGBB	-.0620	.06150	.328	-.1924	.0684
	100 MG/KGBB	-.0433	.06150	.491	-.1737	.0870
	10 MG/KGBB	.0520	.06150	.328	-.0684	.1924
	1 MG/KGBB	.0287	.06150	.647	-.1017	.1590
	0.1MG/KGBB	.0070	.06150	.911	-.1234	.1374
	0.01MG/KGBB	.0643	.06150	.311	-.0660	.1947
	K+	.1017	.06150	.118	-.0287	.2320
K+	1000 MG/KGBB	-.1637(*)	.06150	.017	-.2940	-.0333
	100 MG/KGBB	-.1450(*)	.06150	.031	-.2754	-.0146
	10 MG/KGBB	-.0397	.06150	.528	-.1700	.0907
	1 MG/KGBB	-.0730	.06150	.253	-.2034	.0674
	0.1MG/KGBB	-.0947	.06150	.143	-.2250	.0357
	0.01MG/KGBB	-.0373	.06150	.552	-.1677	.0930
	K-	-.1017	.06150	.118	-.2320	.0287

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

Lampiran 17

Compare Means Kadar Hematin

Notes

Input	Data	C:\Documents and Settings\MARIHOT\My Documents\PENELITIAN\PENELITIAN\DATA EKSPERIMENTAL\DATA Eksperimen.sav
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	24
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY hematin BY dosis /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = LSD ALPHA(.05).	
Resources	Elapsed Time	0:00:00.20

Descriptives

TOTAL FREE HEMATIN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1000 MG/KG BB	3	81.6220	10.63076	6.13767	55.2137	108.0303	69.79	90.38
100 MG/KG BB	3	81.8967	7.09586	4.09680	64.2696	99.5238	74.47	88.60
10 MG/KG BB	3	63.1717	4.27194	2.46641	52.5596	73.7838	60.65	68.10
1 MG/KG BB	3	60.8247	23.71071	13.88939	1.7240	119.5253	40.67	86.84
0.1MG/KG BB	3	66.0760	22.73312	13.12497	9.6038	122.5482	43.19	88.65
0.01MG/KG BB	3	59.9397	11.55036	6.66861	31.2470	88.6324	52.50	73.25
K-	3	77.3503	6.73807	3.89023	60.6120	94.0886	71.99	84.91
K+	3	25.8120	22.96228	13.25727	-31.229	82.8534	8.30	51.81
Total	24	64.5616	21.69609	4.42870	55.4002	73.7231	8.30	90.36

Test of Homogeneity of Variances

TOTAL FREE HEMATIN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.009	7	16	.117

ANOVA**TOTAL FREE HEMATIN**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6893.196	7	984.742	4.006	.010
Within Groups	3933.368	16	245.836		
Total	10826.564	23			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: TOTAL FREE HEMATIN

LSD

(I) DOSIS PERLAKUAN	(J) DOSIS PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	1000 MG/KGBB	-4.2717	12.80197	.743	-31.4106	22.8673
	100 MG/KGBB	-4.5483	12.80197	.727	-31.6853	22.5928
	10 MG/KGBB	14.1787	12.80197	.284	-12.9603	41.3176
	1 MG/KGBB	16.7257	12.80197	.210	-10.4133	43.8646
	0.1MG/KGBB	11.2743	12.80197	.392	-15.8646	38.4133
	0.01MG/KGBB	17.4107	12.80197	.193	-9.7263	44.5496
	K+	51.5383(*)	12.80197	.001	24.3994	78.6773
K+	1000 MG/KGBB	-56.8100(*)	12.80197	.000	-82.9490	-28.6710
	100 MG/KGBB	-56.0847(*)	12.80197	.000	-83.2236	-28.9457
	10 MG/KGBB	-37.3597(*)	12.80197	.010	-64.4986	-10.2207
	1 MG/KGBB	-34.8127(*)	12.80197	.015	-61.9516	-7.8737
	0.1MG/KGBB	-40.2640(*)	12.80197	.006	-67.4030	-13.1250
	0.01MG/KGBB	-34.1277(*)	12.80197	.017	-61.2666	-6.9887
	K-	-51.5383(*)	12.80197	.001	-78.6773	-24.3994

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

Lampiran 18

Probit Ekstrak Air *Momordica charantia* LINN

Notes

Output Created		07-MAR-2005 18:19:14
Input	Data	C:\Documents and Settings\MARIHOT\My Documents\PENELITIAN\PENELITIAN\data\probit1.sav
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	6
Syntax		PROBIT hambat OF total WITH dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(1).
Resources	Elapsed Time	0:00:00.02

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

6 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 0 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 5 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.03626	.03037	1.19400
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-.26658	.05413	-4.92442

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square =3.316 DF = 4 P =.506

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-2.00	100.0	34.8	36.727	-1.937	.36727
-1.00	100.0	40.8	38.101	2.699	.38101
.00	100.0	34.8	39.490	-4.690	.39490
1.00	100.0	46.5	40.892	5.618	.40892
2.00	100.0	44.1	42.306	1.784	.42306
3.00	100.0	40.3	43.730	-3.470	.43730

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	1.545200E-57	.	.
.02	5.100453E-50	.	.
.03	3.005623E-45	.	.
.04	1.165373E-41	.	.
.05	9.670688E-39	.	.
.06	2.951063E-36	.	.
.07	4.450589E-34	.	.
.08	3.971457E-32	.	.
.09	2.359831E-30	.	.
.10	1.013415E-28	.	.
.15	5.840586E-22	.	.
.20	1.379183E-16	.	.
.25	5.614608E-12	.	.
.30	.00000	.	.
.35	.00053	.	.
.40	2.31721	.	.
.45	7703.71751	.	.
.50	22521592.6609	.	.
.55	65841216936.9	.	.
.60	2.188933E+14	.	.
.65	9.554864E+17	.	.
.70	6.549799E+21	.	.
.75	9.033973E+25	.	.
.80	3.677700E+30	.	.
.85	8.684439E+35	.	.
.90	5.005078E+42	.	.
.91	2.149400E+44	.	.
.92	1.277169E+46	.	.
.93	1.139674E+48	.	.
.94	1.718778E+50	.	.
.95	5.244943E+52	.	.
.96	4.352446E+55	.	.
.97	1.687577E+59	.	.
.98	9.944649E+63	.	.
.99	3.282565E+71	.	.