

**Actinomycetes ANTIMALARIAL THERAPY (AAT) :
AGEN TERAPI MALARIA ISOLAT BAKTERI Actinomycetes PADA MENCIT
Balb/c TERINFEKSI *Plasmodium berghei*
BERBASIS UBIQUITIN PROTEASOME SYSTEM**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Nofi Nurina Ramadhani

NIM: 0910710019

**JURUSAN PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

***Actinomycetes ANTIMALARIAL THERAPY (AAT) :
AGEN TERAPI MALARIA ISOLAT BAKTERI *Actinomycetes*
PADA MENCIT Balb/c TERINFEKSI *Plasmodium berghei*
BERBASIS UBIQUITIN PROTEASOME SYSTEM***

Oleh:

Nofi Nurina Ramadhani

NIM: 0910710019

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 31 Oktober 2012

dan dinyatakan lulus oleh:

Pembimbing,

Dr.dr.Loeki Enggar Fitri, Mkes, SpPark

NIP. 19641013 199103 2 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan

Prof. Dr.dr.Teguh Wahyu Sardiono,DTMH, MSc, SpPark (K)

NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul "*Actinomycetes Antimalarial Therapy (AAT) : Agen Terapi Malaria Isolat Bakteri Actinomycetes Pada Mencit Balb/c Terinfeksi Plasmodium berghei Berbasis Ubiquitin Proteasome System*".

Asal mula ketertarikan terhadap topik dalam tugas akhir ini didasari oleh fakta bahwa Indonesia merupakan salah satu dari negara kepulauan yang memiliki beragam penyakit infeksi tropis, salah satunya adalah malaria. Dan hingga kini, malaria belum mampu diberantas secara optimal mengingat kerentanan terhadap resistensi antibiotik yang cenderung meningkat. Dengan melalui pendekatan baru, yakni melalui jalur *Ubiquitin-Proteasome System* yang merupakan jalur degradasi protein residu intraseluler dari kandungan ekstrak metabolit bakteri tanah famili *Actinomycetes Streptomyces hygroscopicus*, diharapkan mampu menciptakan suatu pengembangan baru terhadap target terapi serta variasi terapi terhadap malaria.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Allah SWT, yang tak hentinya menjadi motivasi tertinggi serta memudahkan langkah dalam menuntut ilmu hingga saat ini, memberi karuniaNya yang luar biasa dengan menunjukkan jalan di bangku perkuliahan FKUB,
2. Dr dr. Karyono Mintaroem, SpPA, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya beserta jajarannya.
3. Dr.dr.Loeki Enggar Fitri, MKes, SpParK sebagai dosen pembimbing serta teladan yang dengan luar biasa membimbing untuk bisa menulis dengan baik, senantiasa memberi semangat sejak pengusulan proposal PKM, Pimnas, hingga penyelesaian Tugas Akhir.
4. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
5. Bapak Arif Nurkanto dan Ibu Nur, pihak LIPI yang telah bersedia membantu dalam penyediaan bakteri dari laboratorium mikrobiologi LIPI.
6. Pihak laboratorium - laboratorium terkait yang ada di FKUB, khususnya mbak Heni, Mas Yudha, Mas Ali, Mbak Fitri.
7. Ditjen Dikti yang telah membantu pendanaan PKM Penelitian.
8. Ayahanda dan Ibunda tercinta, Ir. Winarno dan Alfi Handayani, SPi, MP atas limpahan kasih sayang serta support yang tak terbatas. Tak lupa teruntuk adik-adik tersayang Nofi Nurul Fadilla dan Muhammad Farchan Juliansyah yang setia menjadi penghibur dan rekan seperjuangan dalam keluarga.
9. Rekan satu kelompok PKMP, Mas Rivo Yudhinata Brian Nugraha, Annisa Alkarimah, Alfian Wika Cahyono, dan Dyah Laksmi atas kerja sama dan pengalaman yang tidak pernah terlupakan.
10. Sahabat di bangku perkuliahan terbaik lim, Siska, Icha, Nydya, Luki, Ifah, Airin, Hendra, Nia. Terimakasih telah memberikan warna dalam hari-hari di kampus FKUB.
11. Sahabat dan kakak-kakak kos Bening 35 yang setia menjadi tempat singgah yang indah dan penyemangat yang tak kenal lelah, Imamatul Hikmah, Mbak Dayu, Mbak Marcya.

12. Sahabat Chingu yang menjadi motivasi tanpa henti dari beragam Institusi, Dyah Ayu, Dian Rosalina, Arannya Puspita, Aliffia Nurlita, Tanalin Nur Firdausi, Sugesti Nanti, Rissa Romadhona, Dita Yonawati.
13. Keluarga besar Lembaga Kerohanian Islam (LKI) dan Lembaga Studi Ilmiah Mahasiswa (LSIM) yang selalu bersemangat dan memberikan motivasi untuk terus berjuang.
14. Keluarga besar Pendidikan Dokter 2009 yang senantiasa menjadi sahabat setia selama menjejak pendidikan di FKUB.
15. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Malang, 1 Maret 2013

Penulis



ABSTRAK

Ramadhani, Nofi Nurina. 2013. ***Actinomycetes Antimalarial Therapy (AAT) : Agen Terapi Malaria Isolat Bakteri Actinomycetes Pada Mencit Balb/c Terinfeksi Plasmodium berghei Berbasis Ubiquitin Proteasome System***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: Dr.dr.Loeki Enggar Fitri, MKes, SpParK.

Kejadian resistensi obat antimalaria sudah terjadi pada monoterapi malaria konvensional bahkan pada lini pertama antimalaria *Artemisinin Combination Therapy* (ACT) sehingga diperlukan penemuan baru pengobatan malaria. *Streptomyces hygroscopicus*, bakteri golongan *Actinomycetes*, memproduksi analog eponemycin (kelas epoxiketone) yang merupakan *proteasome inhibitor*. Pemberian ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* terbukti menghambat fungsi *Ubiquitin-Proteasome System* (UPS) yang berperan dalam siklus sel, *DNA repair*, dan degradasi protein untuk mempertahankan homeostasis sel. Mencit Balb/C dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan (ekstrak metabolit 130 µg/kgBB, 580 µg/kgBB, dan 2600 µg/kgBB) dan kontrol positif. Infeksi dilakukan dengan menyuntikkan *P.berghei* 10⁷ intraperitoneal dan terapi diberikan sebanyak lima kali intraperitoneal. Akumulasi protein diamati melalui terbentuknya *band* protein terpoliubiquitinasi pada kelompok perlakuan dan kontrol positif, serta terdapat peningkatan densitas *band* pada kelompok perlakuan. Akumulasi poliubiquitinasi tertinggi ditunjukkan pada kelompok perlakuan dosis 2600 µg/kgBB, yakni dengan optikal densitas (OD) sebesar 30,35. Uji *Kruskal Wallis* menggunakan data kuantifikasi densitometri *Western blot* belum menunjukkan perbedaan bermakna antarperlakuan ($p=0,927$). Pada uji korelasi *Pearson* tidak ada hubungan antara peningkatan dosis terhadap *Western blot Ubiquitin* ($p= 0,968$). Meskipun demikian, secara kualitatif adanya *band* protein pada *Western blot Ubiquitin* telah membuktikan adanya peranan *ubiquitin* di dalam kelangsungan hidup malaria. Selain itu, analog *eponemycin* dalam metabolit *S. hygroscopicus* berpotensi menjadi pengobatan terbaru malaria karena dapat berikatan dengan subunit $\beta 1$ dan $\beta 5$ proteasome sehingga menyebabkan gangguan dalam proses degradasi protein residu intraselular parasit.

Kata kunci : Malaria, *Streptomyces hygroscopicus*, *P.berghei*, *Ubiquitin*, UPS.

ABSTRACT

Ramadhani, Nofi Nurina. 2013. ***Actinomycetes Antimalarial Therapy (AAT) As Malaria Therapeutical Agent Using Actinomycetes Bacteria In Balb/c Mice Infected by Plasmodium berghei : Ubiquitin Proteasome System Approached.*** Final Assignment, Medicine Major, Faculty of Medicine Brawijaya Univeristy. Supervisor: Dr.dr.Loeki Enggar Fitri, MKes, SpParK.

Malaria is still included as one of the most important parasitic infection in the world and the efforts to reduce the high mortality and morbidity of malaria is quite difficult due to the development of anti-malarial drug resistance. World Health Organization (WHO) has recommended the use of artemisinin-based combination therapy (ACT) as first-line malaria treatment to prevent treatment failure, resistance, and relapse, however the combination of artemether-lumefantrine has been decreasing of efficacy in several areas. *Streptomyces hygroscopicus*, a member of family of Actinomycetes produce eponemycin, a proteasome inhibitor that can inhibit Ubiquitin-Proteasome System (UPS) function in eucaryotic cell. This research was done to reveal if eponemycin that is contained in metabolite extract of *S. hygroscopicus* can inhibit Ubiquitin-Proteasome System (UPS) function of *Plasmodium berghei*. This study was an experimental study using *P.berghei* infected Balb/C mice as malaria model. Samples were divided into 1 control group and 3 treatment groups, there were mice that infected with *P.berghei* and treated intraperitoneally with metabolite extract of *S. hygroscopicus* dose 130 µg/kgBW, 580 µg/kgBW, and 2600 µg/kgBW for 5 days. Mice were infected through the peritoneal injection of 10^7 *P.Berghei* and the therapy using metabolite extract of *S.hygroscopicus* were given for 5 days intraperitoneally as well. There were accumulation of polyubiquitinated proteins in the treatment groups shown by *Western blot*. The highest accumulation was shown in the third treatment group with 30,35 optical density (OD). *Kruskall Wallis* test using the data of Western blot densitometric quantification yet to show significant differences within treatment groups ($p = 0.927$). Pearson correlation test showed no correlations between concentration of extracts and Western blot Ubiquitin result ($p=0,968$). Nevertheless, the bands on the Western blot Ubiquitin had proved the existence of the role of ubiquitin in the survival of malaria. Analog *eponemycin* in *S. Hygroscopicus* metabolite is a potential candidate for new malarial drug because this component can bind with $\beta 1$ dan $\beta 5$ subunit proteasome, hence the degradation of intracellular protein of parasite will be altered.

Keywords : Malaria, *P.berghei*, *Streptomyces hygroscopicus*, Ubiquitin, UPS

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Singkatan	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Praktis	3
1.5 Manfaat Teoritis	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Malaria	4
2.1.1 Etiologi	4
2.1.1.1 Siklus Hidup Plasmodium.....	5
2.1.1.2 Patogenesis dan Manifestasi Klinis.....	6
2.1.2 Penggolongan Obat Antimalaria Berdasarkan Tempat Kerja.....	8

2.1.3 Resistensi Pengobatan Malaria	11
2.2 Ubiquitin dan Jalur Proteolitik Proteasome	14
2.3 <i>Streptomyces</i>	19
2.3.1 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	19
2.4 Kandungan Metabolit <i>Streptomyces</i>	20
2.4.1 Pterocidin.....	20
2.4.2 Eponemycin.....	20
2.4.3 Geldanamycin.....	21
2.4.4 Trichostatin.....	21
 BAB III KERANGKA KONSEP	
3.1 Kerangka Konsep.....	22
3.2 Hipotesis	22
 BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	23
4.2 Sampel.....	23
4.2.1 Kriteria Inklusi Sampel	23
4.2.2 Jenis Sampel.....	24
4.2.3 Estimasi Besar Sampel.....	24
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	24
4.3.1 Variabel Bebas Penelitian.....	24
4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian	25
4.3.3 Definisi Operasional	25
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	25
4.5 Instrumen Penelitian.....	26

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Mencit	26
4.5.2 Alat dan Bahan Thawing <i>P. Berghei</i>	26
4.5.3 Alat dan Bahan Inokulasi <i>P. Berghei</i> pada mencit	26
4.5.4 Alat dan Bahan Pembuatan Isolasi dan Karakterisasi <i>S. hygroscopicus</i>	26
4.5.5 Alat dan Bahan Pemberian Isolat <i>S. hygroscopicus</i>	26
4.5.6 Alat dan Bahan <i>Western blot</i> Ubiquitin	26
4.5.7 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit	26
4.5.8 Alat untuk Sanitasi dan Higienisasi	26
4.6 Prosedur Penelitian	27
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	27
4.6.2 Thawing <i>P. Berghei</i>	27
4.6.3 Inokulasi <i>P. Berghei</i>	27
4.6.4 <i>Western blot</i> Ubiquitin	28
4.7 Analisis Data	29
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Hasil <i>Western blot</i> Ubiquitin	30
5.2 Densitometri <i>Western blot</i> Ubiquitin	31
BAB VI PEMBAHASAN	
6.1 Mekanisme Penghambatan UPS melalui Ubiquitin	32

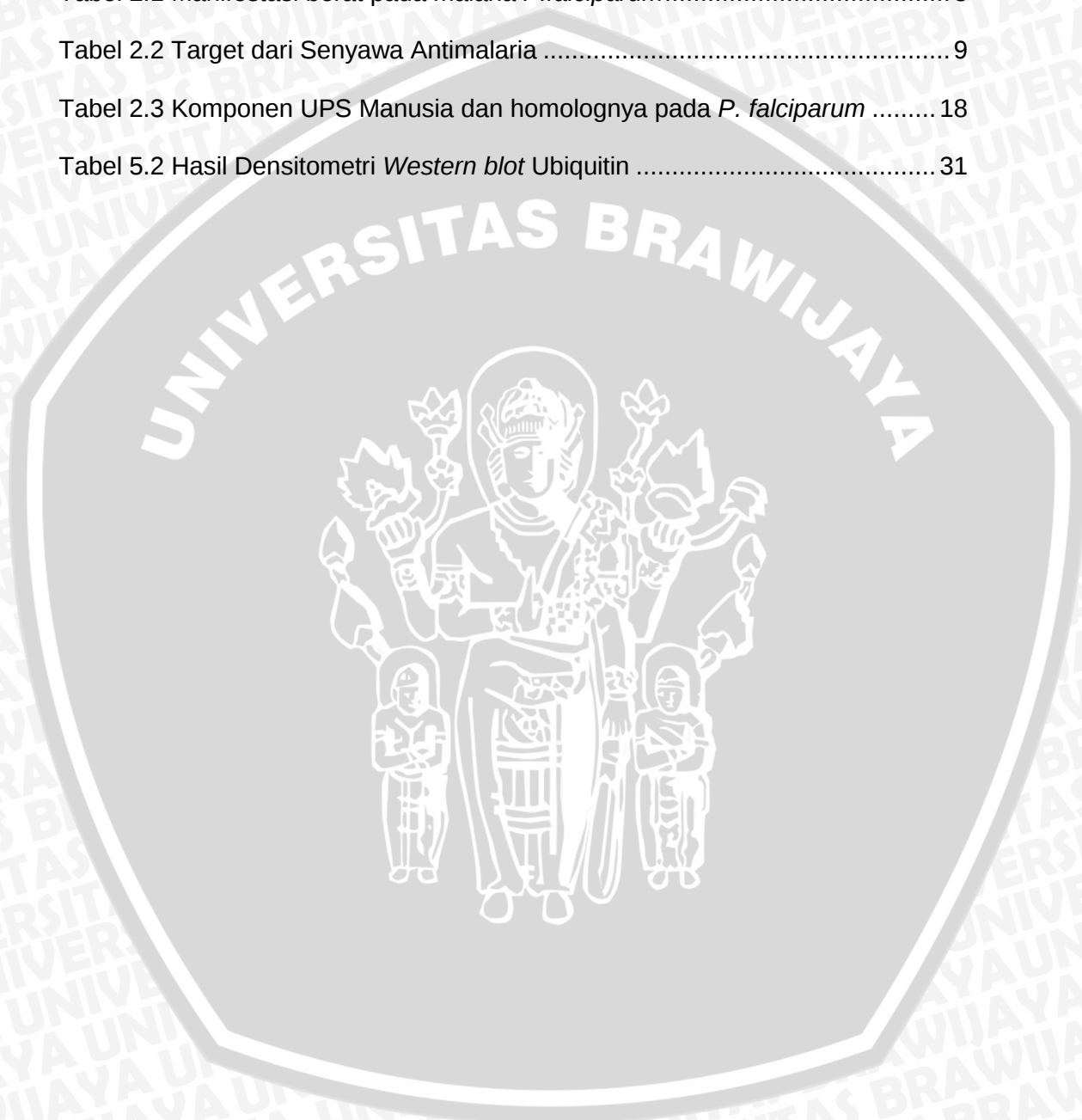
BAB VII PENUTUP

7.1 Kesimpulan	35
7.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN	41



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Manifestasi berat pada malaria <i>P. falciparum</i>	8
Tabel 2.2 Target dari Senyawa Antimalaria	9
Tabel 2.3 Komponen UPS Manusia dan homolognya pada <i>P. falciparum</i>	18
Tabel 5.2 Hasil Densitometri <i>Western blot</i> Ubiquitin	31



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Siklus Hidup <i>Plasmodium</i>	6
Gambar 2.2 Target Aksi Obat Antimalaria pada Organel Subseluler Parasit <i>Plasmodium</i> Intraeritrositik.....	10
Gambar 2.3 Ubiquitin Proteasome System	16
Gambar 5.1 Western blot Ubiquitin dari Ekstrak Protein <i>P.berghei</i>	30
Gambar 5.2 Kuantifikasi hasil Optical Density(OD) Western blot parasit.....	31



DAFTAR SINGKATAN

ACT	: Artemisinin-based Combination Therapy
UPS	: Ubiquitin/Proteasome System
Ub	: Ubiquitin
kDa	: Kilo Dalton
NaCl	: Natrium Chlorida
ScA	: Starch-casein Agar
RhA	: Raffinosa-histidin Agar
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
CM	: Complete Media
I.P.	: Intraperitoneal
EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
OD	: Optical Density





BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Malaria merupakan penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan dunia. Malaria merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh parasit dan menjadi perhatian dunia karena hampir 1,5 hingga 2,7 juta jiwa penduduk dunia meninggal setiap tahunnya (WHO, 2000). Malaria yang menyerang manusia umumnya disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium*. Sebagian besar malaria disebabkan oleh *Plasmodium vivax*, namun *Plasmodium falciparum* seringkali menimbulkan manifestasi dengan tingkat keparahan yang tinggi hingga kematian (Oaks et al, 1991; Chin, 2000). Pada tahun 2008, malaria menyerang 108 negara sehingga menimbulkan 247 juta kasus serta lebih dari 1 juta kematian di seluruh dunia akibat dari penyakit malaria (WHO, 2010).

Indonesia merupakan salah satu negara yang masih berisiko terhadap penyakit malaria. Daerah endemis malaria sebanyak 73,6% dari keseluruhan daerah di Indonesia (Depkes RI, 2008). Kasus baru malaria di Indonesia pada tahun 2009/2010 terdiagnosis adalah 22,9 per 1000 penduduk, dengan kasus terbanyak adalah di Papua sejumlah 261.5, Papua Barat sejumlah 253.4, Nusa Tenggara Timur sejumlah 117.5, dan Maluku Utara sejumlah 103.2 per 1000 penduduk (Riskesdas RI, 2010). Studi epidemiologi di Indonesia menunjukkan 86,4% kasus malaria disebabkan oleh *P. falciparum* (Riskesdas RI, 2010).

Jumlah kasus malaria pada tahun 2006 sebanyak 2 juta kasus dan pada tahun 2007 menurun menjadi 1.774.845 kasus. Penurunan kasus ini mendukung target *Millenium Development Goals* (MDGs) Indonesia dalam mengendalikan

dan menurunkan kasus malaria (Depkes RI, 2009), namun berdasarkan *World Malaria Report* penurunan jumlah kasus di Indonesia tersebut tidak signifikan dan dianggap tidak mengalami perubahan, hal ini juga disebabkan oleh kecilnya skala kegiatan dalam usaha mengendalikan malaria dibandingkan dengan jumlah total populasi yang beresiko (WHO, 2010).

Tantangan terbesar saat ini adalah meningkatnya kejadian resistensi terhadap pengobatan malaria khususnya *P. falciparum*. Pada Januari 2006, *World Health Organization (WHO) Guidelines for The Treatment of Malaria* menyatakan bahwa monoterapi artemisinin sudah tidak lagi direkomendasikan karena penemuan kasus resistensi terhadap monoterapi artemisinin di perbatasan antara Kamboja dan Thailand, Kamboja bagian barat, Myanmar Selatan, perbatasan Cina-Myanmar, dan di Vietnam Selatan (WHO, 2010). Oleh karena itu, WHO merekomendasikan penggunaan *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) yaitu kombinasi artemisinin dengan obat antimalaria lainnya (Garner dan Graves, 2005), yang kemudian diketahui juga telah mengalami resistensi (WHO, 2010).

Berdasarkan data resistensi pengobatan malaria di atas, diperlukan pengembangan obat malaria baru mengingat artemisinin yang merupakan obat lini pertama dalam pengobatan malaria, sudah ditemukan resistensinya baik monoterapi dan kombinasi. *Streptomyces hygroscopicus* (*S. hygroscopicus*) yang termasuk golongan Actinomycetes merupakan bakteri gram positif yang banyak ditemukan di tanah. *Streptomyces hygroscopicus* mengandung *eponemycin* yang berfungsi sebagai antitumor dan antiplasmodial. *Eponemycin* berfungsi sebagai inhibitor *proteasome* pada *Plasmodium* sp. yang ditandai dengan adanya penumpukan *ubiquitin*. *S. hygroscopicus* merupakan bakteri yang mudah

ditemukan di tanah dan lingkungan sekitar dan potensial dikembangkan sebagai obat antimalaria baru.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak metabolit isolat bakteri *S. hygroscopicus* dapat meningkatkan kadar *Ubiquitin* pada mencit balb/c terinfeksi *Plasmodium berghei*?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metabolit isolat bakteri *S. hygroscopicus* terhadap peningkatan kadar *Ubiquitin* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*.

1.4 Manfaat Praktis

1. Tersusunnya artikel ilmiah yang dapat menunjukkan potensi isolat bakteri golongan *S. hygroscopicus* dalam pengobatan malaria dan pengaruhnya terhadap *Ubiquitin*
2. Didapatkan suatu terapi baru dalam pengobatan malaria baik sebagai terapi tunggal atau kombinasi.

1.5 Manfaat Teoritis

1. Dapat dijadikan sebagai dasar teori dalam pengembangan obat malaria sebagai usaha untuk mengatasi resistensi pengobatan malaria.
2. Dapat dijadikan sebagai dasar informasi kepada peneliti, farmasi, dan industri dalam pengembangan pengobatan malaria.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Etiologi

Di Indonesia, ditemukan 4 spesies parasit malaria yang menginfeksi manusia yaitu *P. falcifarum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale*. *Plasmodium falcifarum* menyebabkan malaria tertian maligna (malaria tropika) (Ahmadi, 2008). Dari empat spesies malaria, spesies yang dianggap paling berbahaya adalah *P. falciparum* karena paling mematikan dibandingkan ketiga jenis lainnya yang umumnya kurang berbahaya dan tidak mengancam hidup (Hasibuan, 2010). Saat ini telah ditemukan spesies baru *Plasmodium* yang dapat menyerang manusia, yaitu *Plasmodium knowlesi*, sebuah spesies *Plasmodium* alami kera di Asia Tenggara. Spesies kelima *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*), ditemukan pertama kali pada monyet dan ternyata juga bisa menjadi patogen untuk manusia (McCutchan et al, 2008).

Malaria ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung *Plasmodium*. Genus *Anopheles* terdapat 400 spesies, 80 spesies diantaranya terbukti sebagai vektor malaria, dan 22 diantaranya ditemukan di Indonesia (Ahmadi, 2008). Hampir sebagian besar masyarakat di Indonesia yakni sebanyak 250 juta jiwa berada pada area endemik malaria. Terdapat insiden dan prevalensi malaria yang lebih tinggi oleh *P. falciparum* dan *P. Vivax* pada area selain Jawa dan Bali (Karyana et al, 2008).

2.1.1.1 Siklus Hidup *Plasmodium*

Siklus hidup *Plasmodium* sp. dapat dibagi menjadi dua, aseksual dan seksual. Fase aseksual terjadi di dalam tubuh manusia dan fase seksual terjadi di dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Fase aseksual dibagi menjadi dua, fase pre-eritrosit dan fase eritrosit (Brooks, *et al.*, 2004).

Semua *Plasmodium* sp. ditransmisikan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Pada saat nyamuk menggigit manusia, sporozoit yang berada di dalam kelenjar ludah masuk melalui pembuluh darah. Sporozoit beredar dalam darah dalam waktu yang singkat kemudian menginvasi hepatosit. Parasit berkembang menjadi skizon eksoeritrositik di dalam hepar antara 7-10 hari. Setelah hepatosit ruptur maka skizon akan melepas merozoit ke peredaran darah dan ribuan merozoit akan menginvasi eritrosit. Pada *P. vivax* dan *P. ovale*, beberapa parasit akan dorman di dalam hepar membentuk hipnozoit dan akan keluar sewaktu-waktu menyebabkan terjadinya relaps, sedangkan *P. falciparum* dan *P. malariae* tidak memiliki fase hipnozoit atau fase dorman (Gillespie dan Richard, 2001).

Fase eritrosit dimulai ketika merozoit mulai menginvasi eritrosit. Sebuah skizon eksoeritrositik mengandung 10000 – 30000 merozoit yang dapat dilepaskan dan menginvasi eritrosit. Ketika fase ini, merozoit berkembang di dalam eritrosit dan berkembang menjadi *ring form* sampai menjadi tropozoit matur yang diikuti dengan skizogoni untuk membentuk skizon. Tiap-tiap eritrosit yang terinfeksi mengandung 24-32 merozoit. Apabila eritrosit tersebut ruptur, maka merozoit akan lepas dan menginvasi eritrosit lainnya (Gillespie dan Richard, 2001).



Gambar 2.1 Siklus hidup *Plasmodium* (Brooks, et al., 2004).

Subpopulasi dari parasit akan berkembang menjadi gametosit yang akan menginfeksi nyamuk yang menggigit dan memulai fase seksual di dalam tubuhnya. Setelah masuk, gametosit akan berkembang menjadi bentuk mikrogamet dan makrogamet. Kedua gamet tersebut bersatu dan membentuk zigot. Zigot yang membesar akan masuk ke dalam *midgut* dan berubah menjadi ookista. Perkembangan parasit akan terus terjadi sampai oocyst mengandung ribuan sporozoit. Pecahnya ookista akan melepaskan sporozoit tersebut ke kelenjar ludah dan akan masuk ke dalam tubuh manusia lagi apabila terkena gigitan nyamuk (Gillespie dan Richard, 2001).

2.1.1.2 Patogenesis dan Manifestasi Klinis

Infeksi malaria dapat memberikan spektrum manifestasi klinis mulai dari asimtomatis sampai penyakit fulminan yang berakibat kematian. Pola klinis malaria banyak ditentukan oleh spesies parasit yang menginfeksi, usia penderita,

status imun penderita, dan derajat endemisitas malaria di daerah tersebut. Pada infeksi malaria, khususnya yang disebabkan oleh *P. falciparum* terjadi perubahan patologik yang dimungkinkan berhubungan dengan gangguan aliran darah sebagai akibat melekatnya eritrosit berparasit pada endotel kapiler. Patofisiologi malaria adalah multi faktorial dan mungkin berhubungan dengan penghancuran eritrosit sehingga terjadi anemia, anoksia jaringan, hingga hemolisis intravaskuler; adanya mediator endotoksin yang dikeluarkan oleh parasit akan memicu pelepasan mediator proinflamasi oleh makrofag dan menyebabkan perubahan patologis serta sekuestrasi eritrosit yang terinfeksi sehingga memengaruhi afinitas eritrosit terhadap endotelium kapiler darah dalam organ dalam (Ahmadi, 2008).

Infeksi malaria dapat memberikan manifestasi klinis yang berbeda pada daerah dengan endemisitas malaria yang tinggi dan rendah. Pada daerah dengan endemisitas malaria yang tinggi dan stabil setiap tahunnya seperti Afrika, anak – anak daerah setempat dapat terpapar malaria sejak dari lahir. Manifestasi klinis yang umum timbul pada kasus malaria *non-severe* dapat berupa demam yang tidak spesifik. Demam jarang sesuai dengan deskripsi klasik yang terdiri dari siklus demam dengan fase panas tinggi, fase penurunan, dan diikuti menggigil sehingga sulit dibedakan dengan penyakit infeksi anak yang lain. Keadaan anak dapat bervariasi tergantung temperatur tubuhnya. Gejala penyerta yang ada dapat berupa batuk, nyeri abdomen, muntah, dan diare ringan. Anak yang lebih dewasa dapat mengeluh sakit kepala dan nyeri seluruh tubuh. Pada daerah dengan endemisitas yang stabil, infeksi malaria ataupun penyakit yang diakibatkannya tidak dapat didiagnosa berdasarkan tampilan klinis dengan

parameter tertentu. Oleh karena itu, definisi klinis berdasarkan pada epidemiologi dan densitas parasit sangat diperlukan (Marsh, 2005) .

Kasus malaria berat memiliki definisi yang beragam tergantung dari tujuan pendefinisian. Pendefinisian malaria berat dapat berdasarkan pada survey epidemiologi, *clinical trial*, dan peran pelayanan kesehatan. Ada dua keparahan yang penting pada infeksi malaria yaitu adanya gangguan kesadaran dan distress pernapasan dalam berbagai derajat. Hal ini merupakan indikasi rawat inap di rumah sakit. Beberapa manifestasi klinis berat dijelaskan pada gambar berikut (Marsh, 2005).

Tabel 2.1 Manifestasi berat pada malaria *P.falciparum* (Marsh, 2005)

	Frequency [†]	
	African Children	Non-Immune Adults
Clinical Manifestations		
Prostration	***	***
Impaired consciousness	***	**
Deep laboured breathing (respiratory distress)	***	*
Multiple convulsions	***	*
Circulatory collapse	*	*
Pulmonary Oedema (radiological)	(*)	*
Abnormal bleeding	(*)	*
Jaundice	*	***
Haemoglobinuria	(*)	*
Laboratory Indices		
Severe anaemia	***	*
Hypoglycaemia	***	**
Acidosis	***	**
Hyperlactataemia	***	**
Hyperparasitaemia	**	*
Renal impairment	*	***

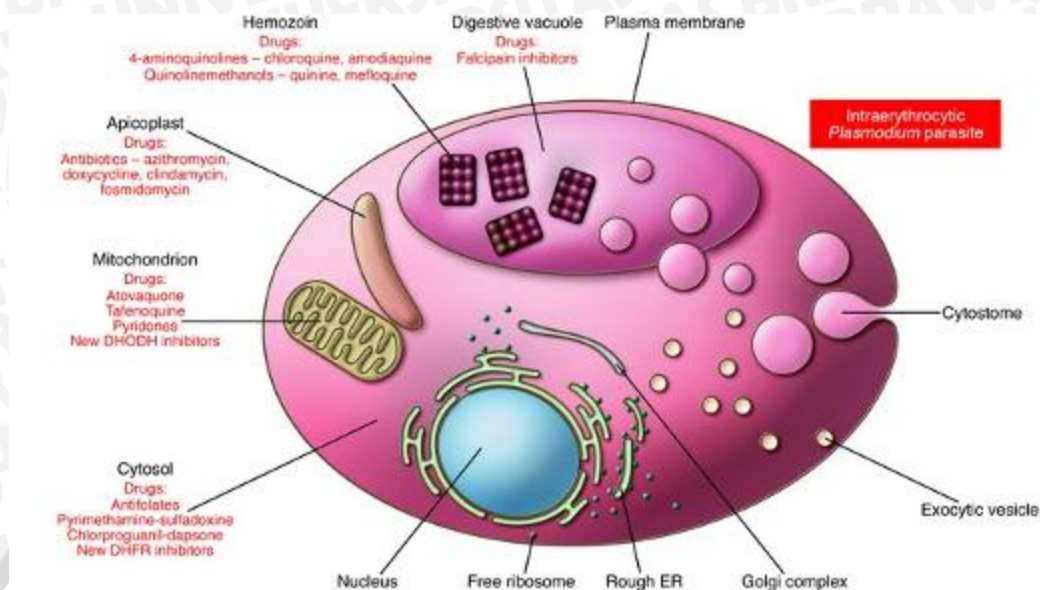
[†] Relative Frequency, (*)=very rare.

2.1.2 Penggolongan Obat Anti Malaria Berdasarkan Tempat Kerja Obat Anti Malaria

Obat antimalaria memberikan pengaruh pada organel subseluler Plasmodium dengan mengganggu proses atau metabolisme pada organel subseluler yang berbeda. Beberapa mekanisme kerja dan target dari obat anti-malaria seperti pada tabel ini.

Tabel 2.2 Target dari Senyawa Antimalaria (Rosenthal, 2003)

Lokasi target	Jalur Mekanisme	Molekul Target	Terapi yang ada	Komponen Baru	Referensi
Sitosol	metabolisme folat	Dihidrofolat reduktase	Pyrimetamine, proguanil	Klorproguanil	Nzila <i>et al.</i> , 2000 Mutabingwa <i>et al.</i> , 2001
		Dihidropteroat sintase	sulfadoxine, dapsone		
		Timidilate sintase		Turunan 5-fluorocorotate Gossypol	Rahod <i>et al.</i> , 1992 Razakantoanina <i>et al.</i> , 2000
membran parasite	glikolisis	Laktat dehidrogenase			Wengelnik <i>et al.</i> , 2002
	Sintesis fosfolipid Membran transport	Transporter kholin		G25 Dimer dinukleosida	Gero <i>et al.</i> , 2000
vakuola makanan	Polimerisasi heme	Hemozoin	quinolin	quinolin baru	De <i>et al.</i> , 1998
	Hidrolisis hemoglobin	Plasmeptsin		Inhibitor Protease	Stock <i>et al.</i> , 2002 Francis <i>et al.</i> , 1994 Haque <i>et al.</i> , 1999
		Falcipains		Inhibitor Protease	Rosenthal, 2001b; Shenai <i>et al.</i> , 2003 Vennesstrom <i>et al.</i> , 2000;
	Pembentukan radikal bebas	Tidak diketahui	artemisin	Peroksida baru	Borsnik <i>et al.</i> , 2002
Mitokondria	transport elektron	Cyt. C Oksidoreduktase	atovaquon		
Apikoplas	Sintesis protein	Apikoplast ribosom	antibiotik		
	Sintesis DNA	DNA girase	qinolon		
	Transkripsi Biosintesis asam lemak Tipe Tipe II	RNA polimerase	Rifampin		
		FabH		Thiolaktomicin	Waller <i>et al.</i> , 1998 Surolia and Surolia, 2001
	Sintesis Isoprenoid Farnesilasi Protein	FabI DOXP reduktoisomerase Farnesil transferase		Triklosan Fosmidomicin Peptidomimetik	Jomaa <i>et al.</i> , 1999 Onkanda <i>et al.</i> , 2001 Chacrabarti <i>et al.</i> , 2002



Gambar 2.2 Target aksi obat antimalaria pada organel subseluler parasit Plasmodium intraeritrositik (Greenwood et al., 2008)

Obat antimalaria bekerja dengan cara mengganggu proses atau jalur metabolisme di dalam organel subseluler yang berbeda (Gambar 2.2). Obat golongan 4-aminokuinolin (klorokuin, amodiakuin) dan kuinolin metanol (kuinin dan meflokuin) berkonsentrasi dalam vakoula makanan yang bersifat asam. Obat golongan ini sangat esensial dalam mengganggu proses pencernaan hemoglobin oleh parasit dengan jalan mengadakan interaksi dengan β -hematin atau menghambat pembentukan hemozoin. *Falcipain inhibitor* bekerja dengan cara menghambat enzim plasmepsin dan enzim falcipain yang berperan dalam pemecahan globin menjadi asam amino. Hemozoin dan asam amino diperlukan untuk pertumbuhan parasit sehingga jika pembentukan dihambat maka parasit akan mati. Antibiotik seperti azitromisin, doksisisiklin, dan klindamisin bekerja di dalam organel plastid seperti kloroplas yang disebut apikoplas. Obat ini menghambat translasi protein sehingga progeni parasit yang diberi obat mengalami kematian. Atovakuon dan senyawa lain tertentu menghambat transport elektron dalam mitokondria dan melalui penghambatan

oksidoreduktase sitokrom C. Antifolat mengganggu biosintesis folat *de novo* dalam sitosol. Obat anti-malaria Sulfadoksin-Pyrimetamin (SP) dan kombinasi baru Klorproguanil-Dapson (Lapdap) merupakan inhibitor kompetitif yang berperan dalam jalur folat. Generasi obat dari Artemisinin menghasilkan radikal bebas yang berfungsi untuk mengalkilasi membran parasit (Greenwood *et al*, 2008). *Ubiquitin – Proteasome System* merupakan target baru pengobatan malaria yang cukup potensial untuk dikembangkan. Selama ini inhibitor *proteasome*, seperti eponemycin, epoxomycin, PS-341, dan lactacystin, merupakan obat yang dikembangkan sebagai terapi kanker. Pengembangan inhibitor *proteasome* merupakan jalur terapi malaria baru yang potensial untuk dikembangkan.

2.1.3 Resistensi Pengobatan Malaria

Resistensi obat adalah salah satu hambatan terbesar dalam usaha menurunkan jumlah kasus malaria. Sampai saat ini, tiga dari lima spesies penyebab malaria yaitu, *P. falciparum*, *P. vivax* dan *P. malariae* diketahui sudah mengalami resistensi terhadap obat. Resistensi obat dipersulit dengan adanya resisten silang yang terjadi diantara obat dengan mekanisme kerja yang sama (WHO, 2010).

Pada Januari 2006, *WHO Guidelines for The Treatment of Malaria* menyatakan bahwa monoterapi artemisinin sudah tidak lagi direkomendasikan. Hal ini dikarenakan penemuan kasus resistensi monoterapi artemisinin di perbatasan antara Kamboja dan Thailand, Kamboja bagian barat, Myanmar selatan, perbatasan Cina-Myanmar, dan di Vietnam selatan. Saat ini tercatat bahwa kasus resistensi tidak terbatas hanya pada monoterapi artemisinin tetapi juga terjadi pada ACT. Kegagalan pengobatan menggunakan

kombinasi artesunate-amodiaquine ditemukan dalam 4 studi di Indonesia (WHO, 2010).

Mekanisme terjadinya resistensi obat belum diketahui dengan pasti tetapi diduga bahwa resistensi terjadi karena mutasi gen, mutasi ini terjadi karena tekanan obat atau penggunaan obat dalam dosis subkuratif. Menurut Clyde, Cowman dalam Tarigan (2003) klorokuin bekerja dengan mengikat cincin feriprotoporfirin IX suatu hematin yang merupakan hasil metabolisme hemoglobin didalam parasit. Ikatan feriprotoporfirin IX-klorokuin ini bersifat melisiskan membran parasit sehingga parasit mati. Resistensi parasit terhadap klorokuin terjadi karena tempat ikatan klorokuin pada eritrosit berkurang sehingga parasit dalam eritrosit tidak dapat dibunuh dan mutasi terjadi multigenetik sehingga resisten cepat terjadi.

Klorokuin adalah obat antimalaria pada pertengahan kedua abad 20an, tetapi peningkatan kecepatan resistensinya menimbulkan perubahan pengobatan lini pertama di Tanzania dengan ditetapkannya obat kombinasi sufadoxin-pirimetamin pada 2001 sebagai pengganti klorokuin, tetapi resistensi pada sufadoxin-pirimetamin juga cepat terjadi dan kegagalan terapi terjadi di Muheza, Tanzania, sehingga pada tahun 2006 di Tanzania artemisinin kombinasi digunakan sebagai obat lini pertama. Kejadian resistensi antimalaria klorokuin dihubungkan dengan adanya perubahan pada asam amino lysin menjadi Threonine pada kodon 76 dari *chloroquin resistance transporter gen (pfcr1)* *Plasmodium falciparum*, juga adanya mutasi dari asparagin menjadi tyrosin pada kodon 86 pada *multidrug resistant gen (pfmdr)*. Disamping itu, mutasi pada gen *pfmdr1* N86 dihubungkan juga dengan terjadinya resistensi pada lumefatrine, yang secara luas obat ini digunakan sebagai kombinasi bersama dengan

artemether, Mutasi pada gen ini juga menyebabkan penurunan sensitivitas *Plasmodium falciparum* pada artemisinin (Djimde et al, 2001 ; Duraisingh et al, 2005)

Pirimetamin bekerja dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase sehingga parasit tidak mampu membuat asam tetrahidrofolat akibatnya parasit tidak mampu melanjutkan siklus hidupnya yang akhirnya akan difagosit. Sulfadoksin bekerja dengan mengadakan kompetisi dengan PABA (*para amino benzoic acid*) dalam memperebutkan enzim dihidrofolat sintase sehingga pembentukan asam dihidrofolate terganggu dan asam folat yang diperlukan parasit tidak terbentuk. Resistensi pada obat pirimetamin dan sulfadoksin disebabkan karena mutasi gen sehingga parasit mampu menggunakan jalur metabolisme lain yang dapat terhindar dari pengaruh obat. Pada umumnya bila terjadi resistensi terhadap suatu obat malaria akan diikuti dengan resistensi obat malaria lainnya (Alker, et al.,2005).

Resistensi Sulfadoksin –Pirimetamin dihubungkan dengan mutasi pada gen dihidrofolate reduktase (*pf dhfr*) dan dihidropterone sintase (*pf dhps*). Pirimetamin selektif inhibitor kompetitif pada enzim dihidrofolate reduktase, Sedangkan obat Sulfadoksin menghambat pembentukan dihidropteroate sintase pada awal pembentukan folate. Beberapa titik mutasi yang berhubungan dengan kejadian resistensi obat antifolate merupakan mutasi yang berlipat (*triple pf dhfr* 151, R59, N108, dan *double pf dhps* G437,E540) Hal ini diyakini sebagai penyebab kegagalan terapi obat Sulfadoksin –Pirimetamin (Kublin et al, 2002).

Atovaquone-proguanil adalah obat antimalaria yang relatif baru yang bekerja dengan menghambat transport elektron mitokondria. Titik mutasi pada gen *pf cytb* dikodon 268 sebagai penyebab resistensi pada kombinasi obat ini.

Kegagalan pengobatan dengan obat kombinasi Atovaquone-proguanil pada *traveller* dihubungkan dengan mutasi pada gen *pfcytb* dikodon 268 yang disebut sebagai T802A dan A803C. Adanya mutasi gen *pfcytb* ini di Luanda, Angola maka obat ini direkomendasikan sebagai profilaksis pada *traveller* (Wichman *et al*, 2004).

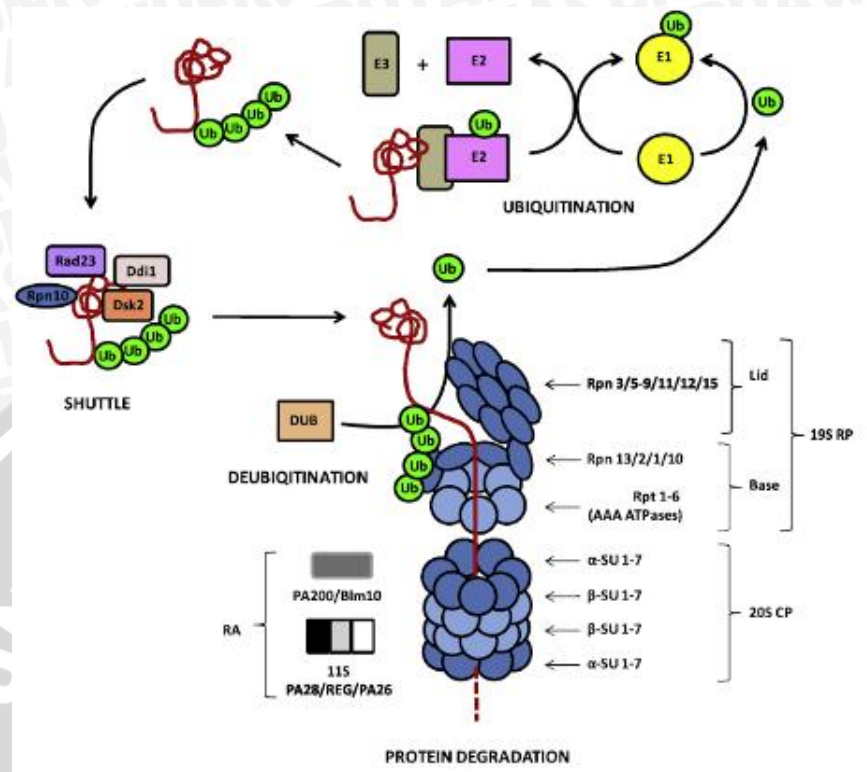
Obat antimalaria artemisinin berinteraksi dan selektif menghambat *PfATPase6*. Hasil studi secara *in vivo* menunjukkan bahwa *Plasmodium falciparum* hambatannya meningkat (IC₅₀) pada artemisinin dan menunjukkan mutasi titik yang spesifik pada kodon S769N pada lokus ATPase, dan dijelaskan juga bahwa mutasi ATPase6 A623E dan E431K dihubungkan juga dengan penurunan kepekaan *P. falciparum* pada artemisinin. Hasil ini merupakan keadaan yang membahayakan akan terjadinya resistensi artemisinin yang meluas (Mugittu, 2006).

2.2 Ubiquitin dan Jalur Proteolitik Proteasome

Ubiquitin – Proteasome System (UPS) merupakan sistem yang mengatur kebanyakan protein pada sel eukariot. *Ubiquitin – Proteasome System* bertanggung jawab terhadap kualitas protein, proliferasi sel, kematian sel, dan signal transduksi. Kontrol protein ada *P. falciparum* sangat penting oleh karena : (1) fase eritrosit *Plasmodium* memiliki kecepatan replikasi yang tinggi, (2) ukuran protein *Plasmodium* cukup besar, (3) *low complexity region* cukup banyak di antara dan di dalam *globular domain*, dan (4) protein *Plasmodium* tertekan oleh adanya panas akibat demam pada penderita. Hal tersebut merupakan tantangan bagi proses *folding* protein dan mesin pendegradasi protein untuk mencegah adanya akumulasi lethal dari protein nonfungsional dan *misfolded*. *Ubiquitin – Proteasome System* pada *Plasmodium* merupakan 20S

proteasome yang aktif secara enzimatik dan diekspresikan sepanjang siklus hidup *Plasmodium* (Kreidenweiss, 2008).

Proteasome merupakan salah satu tipe jalur proteolisis makromolekul yang terdapat mulai dari archaeobakteri sampai yeast dan manusia. Struktur *proteasome* ditentukan dengan menggunakan mikroskop elektron. *Proteasome* 26S terdiri dari dua subunit (SU) yang berbeda : 20S *core protein* (CP) dengan berat molekul 700 kD yang diapit oleh dua 19S *regulatory particles* (RP). Bentuk *proteasome* yang lain adalah terdiri dari 20S unit diapit oleh dua 11S subunit yang dikenal sebagai *immunoproteasome* yang berperan pada proses antigen kelas I. CP tersusun atas empat cincin heptamer yang terdiri dari dua cincin luar dengan tujuh α -SUs di setiap cincinnya dan dua cincin dalam dengan tujuh β -SUs di setiap cincinnya. Empat cincin tersebut tersusun bertumpuk, sedangkan, partikel 19S terdiri dari 18 subunit yang mengontrol pengenalan, *deubiquitinilasi*, dan *unfolding* dari substrat protein sebelum masuk ke dalam inti katalitik *proteasome* 20S (Delcros, 2003; Aminake et al, 2012).



Gambar 2.3 Ubiquitin – Proteasome System (Aminake et al, 2012)

Proses degradasi protein *proteasome* dimulai dengan *ubiquitinasi* atau konjugasi *ubiquitin* (Ub). Proses ini melibatkan tiga kelompok enzim yang saling berhubungan, yaitu: Ub-activating enzyme E1, Ub-conjugating enzyme E2, dan Ub ligase E3. Seperti dapat dilihat pada gambar 2.3, awalnya E1 berikatan dengan Ub membentuk Ub-E1 *thioester* dan residunya ditransfer ke E2. Selanjutnya, E3 berinteraksi dengan E2 dan protein target sehingga terjadi transfer Ub dari E2 ke residu substrat lysine. Pada *P. falciparum* terdapat delapan *putative E1-like enzymes*, 14 *putative E2-like enzymes*, dan 54 *putative E3-like enzymes*. E3 merupakan enzim yang spesifik terhadap substrat protein yang dibagi menjadi empat kelas utama, yaitu: HECT, the RING, the PHD, dan U-box E3. Substrat yang terubiquitinasi akan ditranspor ke *proteasome* yang dimediasi oleh protein *shuttle*. Protein *ekstraproteasome* pengikat Ub yang berfungsi sebagai protein *shuttle* diantaranya: Rad23, Dsk2, Ddi1, dan Rpn10.

Ortholog protein tersebut yang terdapat di dalam *P. falciparum* adalah PF10_0114 (Rad23), PF11_0142 (Dsk2), dan PF14_0090 (Ddi1). Protein tersebut memiliki *Ub-like domain* (Ubl) yang dapat berikatan dengan reseptor Ub di *proteasome* dan *Ub-binding domain* (UbA) (Aminake *et al*, 2012).

Sebelum degradasi *proteasome*, Ub terlepas dari substrat dan mengalami siklus *ubiquitinasi* lainnya. Pelepasan Ub dimediasi oleh *de-ubiquitinated enzymes* (DUB). Pada manusia DUB terdiri dari lima *family* yaitu: JAMM, UCH, USP, OTU, dan MJD. Semua DUB merupakan protease sistein, kecuali JAMM yang merupakan zinc metalloprotease. RP berfungsi mengenal protein terubiquitinasi, membantu proses *deubiquitinasi*, dan membuka lipatan substrat. RP terdiri dari dua subkompleks, *base* dan *lid*. RP *base* tersusun atas 6 AAA-type ATPase SU (Rpt1-6) dan 4 non-ATPase SU yaitu: Rpn1, Rpn2, Rpn10, dan Rpn13. Rpn 10 dan Rpn13 berfungsi sebagai reseptor *ubiquitin*, sedangkan Rpn1 dan Rpn2 berfungsi sebagai *scaffold*. Rpn10 juga berfungsi sebagai protein penghubung antara *base* dan *lid*. *Lid* terdiri dari 9 Rpn-type SU: Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12, dan Rpn15. Rpn11 berfungsi menimbulkan aktivitas *deubiquitinasi*. Uch2/Uch37 berinteraksi dengan reseptor *proteasome* Ub Rpn13. Ubp6/USP14 dan Uch2/Uch37 dapat berfungsi sebagai enzim "proof-reading" untuk melepaskan rantai Ub dari protein salah terkonjugasi Ub oleh UPS. Substrat ikatan peptida akan terhidrolisis oleh residu aktif threonin N-terminal yang terdapat pada inti β -SUs. Terdapat tiga bagian aktif secara proteolitik dari tujuh β -SUs, yaitu : β 1 yang menyerupai aktivitas caspase, β 2 yang menyerupai aktivitas tripsin, dan β 3 yang menyerupai aktivitas kemotripsin. Oleh karena sisi aktif *proteasome* terletak di dalam barel tertutup, diperlukan aktivator untuk

memfasilitasi akses protein ke dalam CP dalam bentuk tidak terlipat (*unfolded*) (Aminake et al, 2012).

Tabel 2.3 Komponen UPS Manusia dan homolognya pada *P. falciparum* (Aminake et al, 2012)

Ub and ULPs ^a		E3 Ub-ligases ^a	
polyUb	PFL0585w	HECT	MAL8P1.23
L40/UBI	PF13_0346	HECT	PF11_0201
S31/UBI	PF14_0027	HECT	MAL7P1.19
Nedd8	MAL13P1.64	HECT	PF1365c
SUMO	PFE0285c	Cullin	PF08_0094
Hub1	PFL1830w	Cullin	PF1445c
Atg8	PF10_0193	F-box	PF0960c
Urm1	PF11_0393	F-box	PF0710w
<i>E1 Ub-activating enzymes^a</i>		F-box	PFL1565c
UBA1	PFL1245w	U-box	PF08_0020
UBA2	PFL1790w	U-box	PF0365w
UBA3	MAL8P1.75	U-box	PF07_0026
UBA4	PF13_0344	RING finger	PFL2440w
<i>E2 Ub-conjugating enzymes^a</i>		RING finger	PF14_0215
UBC9	PF10740c	RING finger	PF1325c
UBC12	PFL2175w	RING finger	PF0610c
UBC13	PFE1350c	RING finger	PFL0275w
UEV	PFC0255c	RING finger	PF0165c
Other	PFL0190w	RING finger	PF10_0117
Other	PF13_0301	RING finger	PF11_0244
Other	PF0305c	RING finger	PF0355c
Other	PF10_0330	RING finger	PF10_0046
Other	PF08_0085	RING finger	PF14_0054
Other	PFC0855w	RING finger	PFC0740c
Other	PF11030c	RING finger	PF10_0276
PUCHL3	PF14_0576	RING finger	MAL13P1.302
PUCH54	PF11_0177	RING finger	MAL13P1.345
USP14	PFE1355c	RING finger	MAL7P1.155
Josephin	PFL1295w	RING finger	PFC0690c
Josephin	PF11_0125	RING finger	PFL1705w
Mov34	MAL13P1.343	RING finger	PFC0845c
Mov34	PF10630w	RING finger	PF10805w
Mov34	PF10895c	RING finger	PFL1620w
Mov34	PFD0265w	RING finger	PFC0175w
Mov34	PF10_0233	RING finger	PF14_0139
Mov34	PF11_0409	RING finger	PFC0425w
DUF862	PFL0865w	RING finger	MAL13P1.224
DUF862	PF10_0069	RING finger	MAL13P1.122
DUF862	PF10940c	<i>Shuttle proteins</i>	
OTU	PF10_0308	Rad23	PF10_0114
OTU	PF11135c	Dsk2	PF11_0142
OTU	PF11_0428	Ddi1	PF14_0090
WLM	PF10_0092		
Peptidase_C48	PFL1635w		
Peptidase_C48	MAL8P1.157		
Peptidase_C54	PF14_0171		

^a Modified from Pons et al. (2008).

2.3 *Streptomyces*

Genus *Streptomyces* oleh Walksman dan Henrici dideskripsikan sebagai Actinomycetes yang aerobik dan mampu membentuk spora (William *et al.*, 1989 dalam Ceylan *et al.*, 2008). Selain itu, genus ini juga memiliki karakteristik sebagai mikroba uniseluler, memiliki filamen, siklus hidup yang kompleks serta membentuk hifa dan metabolit sekunder. Estimasi saat ini mengindikasikan bahwa hampir 50% dari 20.000 metabolit bioaktif sekunder yang dideskripsikan sejak 1990 berasal dari filamen Aktinomycetes yang diinokulasikan dari tanah (Marinelli, 2009).

Berdasarkan taksonomi, *Streptomyces* juga dikategorikan sebagai bakteri gram positif, memiliki sebuah DNA dengan kadar sitosin dan guanin yang tinggi (69 hingga 73 mol%) dan membentuk substrat yang memiliki banyak cabang ekstensif (Ceylan *et al.*, 2008). Setiap spesies *Streptomyces* yang berbeda memproduksi sekitar 75% antibiotik untuk dunia kesehatan. *Streptomyces* mampu memproduksi lebih dari setengah antibiotik yang kandungan senyawanya bisa dimanfaatkan (Miyadoh, 1993). Untuk menemukan antibiotik baru, beberapa studi telah dilakukan untuk mengisolasi *Streptomyces* dari habitat yang berbeda. Hal ini disebabkan karena identifikasi lingkungan ekologi yang baru merupakan faktor krusial dalam penemuan jenis baru dari Actinomycetes yang juga memiliki senyawa metabolit yang baru pula (Saadoun dan Gharaibeth, 2008 dalam Nurkanto *et al.*, 2010).

2.3.1 *Streptomyces hygoscopicus*

Genus *Streptomyces* adalah salah satu genus yang mendominasi di antara Actinomycetes lainnya. Diketahui bahwa *Streptomyces* merupakan genus yang paling banyak memproduksi antibiotik dan molekul bioaktif dibandingkan

dengan genus lain dari Actinomycetes (Goodfellow dan Simpson 1987; Khamma *et al.* 2008; Solanki *et al.* 2008), bahkan juga lebih tinggi dibandingkan dengan mikroba lain seperti jamur dan yeast. Spektimisin, neomisin, tetrasiklin, nystatin, eritromisin, dan kloramfenikol adalah beberapa contoh dari hasil metabolit yang dijadikan sebagai antibiotik dari *Streptomyces* sp. (Colorado Education, 2012). *Streptomyces hygroscopicus* merupakan salah satu spesies *Streptomyces* sp. yang yang berpotensi menghasilkan antibiotik dari metabolit sekundernya. Pembentukan produk metabolit yang dihasilkan dari proses fermentasi mikroba filamen ini sangat bergantung pada level biomassa, profil morfologis dari kultur, serta lingkungan ekologi yang baru seperti hutan hujan tropis, dasar lautan, gurun pasir, dan daerah es (Nurkanto *et al*, 2010).

2.4 Kandungan Metabolit *Streptomyces*

2.4.1 Pterocidin

Pterocidin merupakan komponen sitotoksik baru yang diisolasi dari *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451. Pterocidin memiliki nama sistematis (5R,6R)-6-[(1E,3E,5S,7R,8S,9Z,11E)-8-Hydroxy-5,9-dimethoxy-7-methyl-1,3,9,11-tetradecatetraen-1-yl]-5-methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. Zat ini menunjukkan aktivitas sitotoksik melawan galur sel kanker manusia dengan IC₅₀ 2,9 – 7,1 µM (Igarashi *et al*, 2006).

2.4.2 Eponemycin

Eponemycin adalah peptida linear a',b' epoxyketone anti-angiogenik yang diisolasi dari *S. hygroscopicus* P247-271. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas terhadap B16 Melanoma. Eponemycin juga ternyata berpengaruh terhadap aktivitas *proteasome* 20S (Won Chin *et al*, 2006).

2.4.3 Geldanamycin

Senyawa ini sedang dalam evaluasi penelitian karena menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap protein chaperone dari heat shock protein (hsp) 90 (Won Chin *et al.*, 2006).

2.4.4. Trichostatin

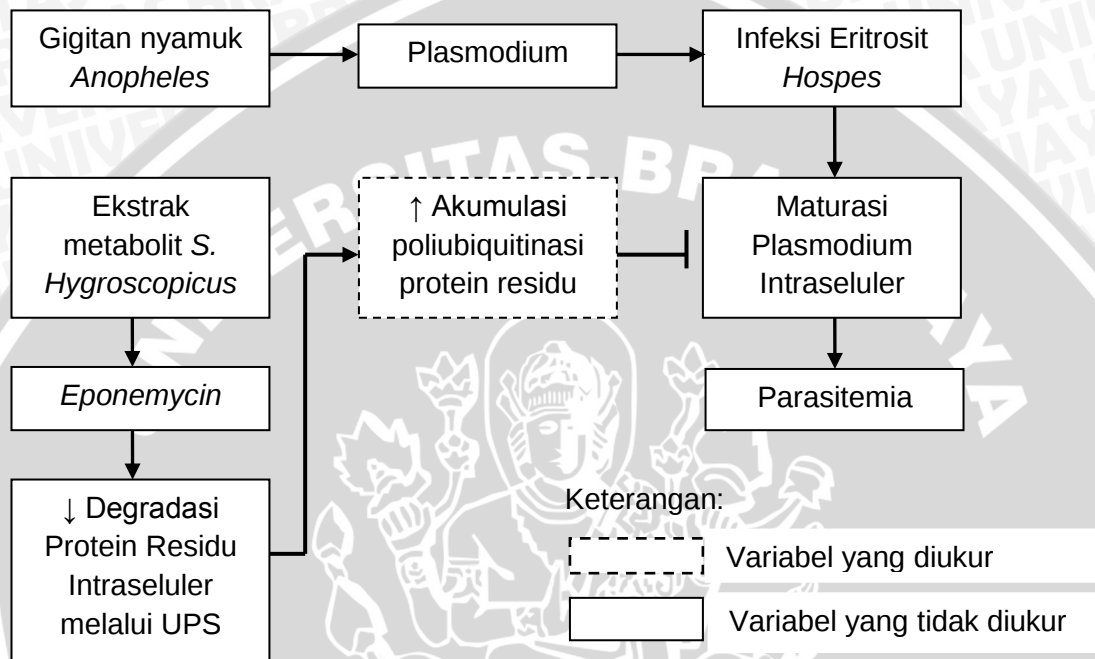
Metabolit ini menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel-sel kanker dan mampu menginhibisi histon deasetilase (HDAC), sehingga menyebabkan growth arrest, differensiasi dan apoptosis dari sel tumor (Won Chin *et al.*, 2006).



BAB III

KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



3.2 Hipotesis

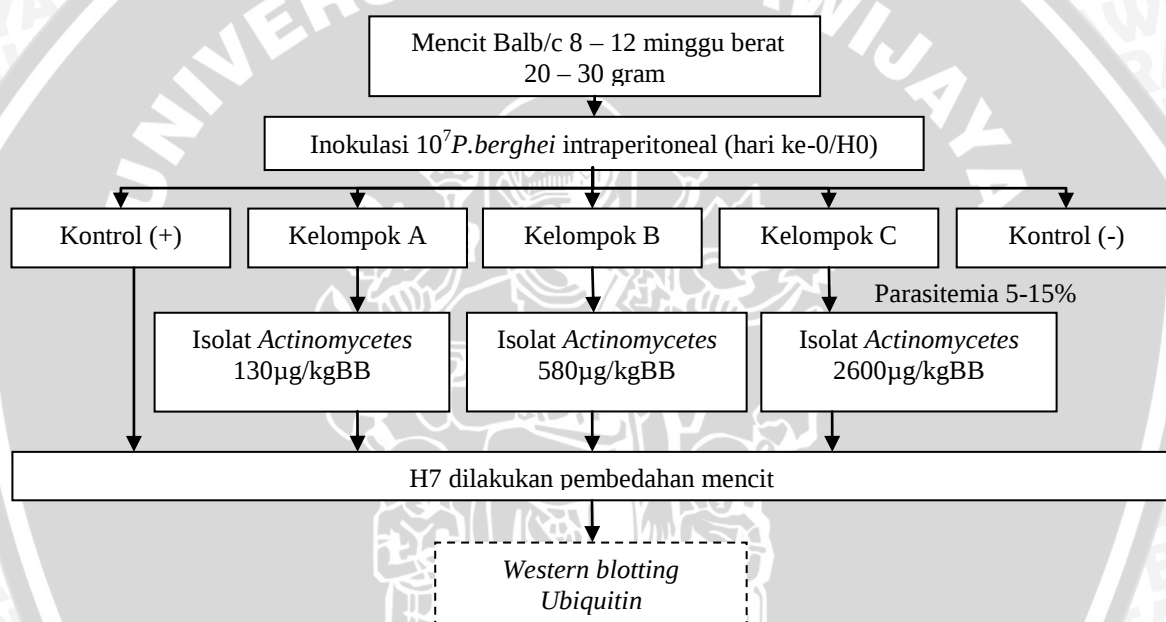
Hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak metabolit isolat bakteri *S. hygroscopicus* dapat meningkatkan kadar Ubiquitin pada mencit balb/c terinfeksi *P. berghei*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan metode yang digunakan yaitu *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Penelitian dilakukan pada hewan coba atau *in vivo*.



4.2 Sampel

4.2.1 Kriteria Inklusi Sampel

Kriteria mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah termasuk galur Balb/c berjenis kelamin jantan yang berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 20 – 30 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif dan belum menerima asupan bahan kimia/xenobiotik dengan cara apapun.

4.2.2 Jenis Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c jantan. Pemakaian mencit sebagai hewan coba yang mudah ditangani, mudah dipelihara, dan memiliki respon imun yang mirip dengan manusia.

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Jumlah mencit dihitung dengan rumus (Andayani, 2003)

dengan: $p(n-1) > 15$ n = jumlah sampel tiap perlakuan, p = jumlah perlakuan.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut:

$$5(n-1) > 15; n-1 > 3; n > 4$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor mencit sehingga jumlah total mencit yang dibutuhkan sejumlah 25 mencit.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak metabolit *S. hygroscopicus*. Hewan coba dibagi dalam lima kelompok dengan lima mencit pada masing – masing kelompok, yaitu:

1. Kontrol positif : mencit diinokulasi 10^7 *P. berghei* saja
2. Perlakuan 1 (P1): mencit diinokulasi 10^7 *P. berghei* + ekstrak metabolit 130 $\mu\text{g/kgBB}$.
3. Perlakuan 2 (P2): mencit yang diinokulasi *P. berghei* + ekstrak metabolit 580 $\mu\text{g/kgBB}$.
4. Perlakuan 3 (P3): mencit yang diinokulasi *P. berghei* + ekstrak metabolit 2600 $\mu\text{g/kgBB}$.

5. Kontrol negatif: mencit sehat tanpa diinokulasi *P. berghei*.

4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah *ubiquitin* yang dievaluasi dengan metode *western blot*.

4.3.3 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Mencit Balb/c :merupakan mencit jantan galur Balb/c yang dibeli dari Universitas Gajah Mada (UGM). Mencit berumur 8 – 12 minggu, berat 20 – 30 gram.
2. *Plasmodium berghei* yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya diinfeksi pada hewan coba sebelum pemberian terapi isolasi *Actinomycetes*. Infeksi dilakukan secara intraperitoneal dengan parasit sebanyak 1×10^7 0,2 cc darah.
3. Bakteri *Streptomyces hygroscopicus* dari laboratorium mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) diisolasi dan diidentifikasi berdasarkan metode yang dilakukan oleh Ambarwati.
4. Pengukuran kadar *Ubiquitin* pada eritrosit mencit terinfeksi dilakukan menggunakan metode *western blot* dengan anti *Ubiquitin* (Biolegend, No. 646302) di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Parasitologi, Biomedik, Mikrobiologi, Biokimia Biomolekuler, Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini dilakukan dalam waktu tiga bulan.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Untuk Pemeliharaan Mencit

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan mencit, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, pakan *cornfeed* (makanan standar mencit).

4.5.2 Alat dan Bahan *Thawing P. berghei*

Alat yang digunakan adalah spuit insulin 1 mL, sentrifugasi, *flask culture*.
Bahan yang digunakan adalah NaCl 12%, NaCl 1,6%, *glucose*.

4.5.3 Alat dan Bahan Inokulasi *P. berghei* pada Mencit

Alat dan bahan yang digunakan adalah spuit insulin 1 mL, alat semprot alkohol, kapas steril, alkohol 70%, hasil thawing *P. berghei*.

4.5.4 Alat dan Bahan Pembuatan Isolasi dan Karakterisasi *S. hygroscopicus*

Starch-casein Agar (ScA), Raffinosa-histidin Agar (RhA) dan *cyclohexamide*.

4.5.5 Alat dan Bahan Pemberian Isolat *S. hygroscopicus*

Spuit insulin 1 mL, alkohol 70%, kapas steril, isolat *Streptomyces hygroscopicus*.

4.5.6 Alat dan Bahan *Western Blot Ubiquitin*

Alat dan bahan yang digunakan adalah gel SDS-PAGE, kertas saring nitroselulose, anti Ubiquitin, dan *Western blot kit*.

4.5.7 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit

Pisau bedah, papan bedah, pinset, kloroform.

4.5.8 Alat untuk Sanitasi dan Higienisasi

Tempat cuci tangan, sarung tangan (*hand gloves*), jas laboratorium, sabun antiseptik, masker, alkohol dan *cotton ball*.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit Balb/c jantan dengan berat 30 – 40 gram, sehat, aktif, dan berbulu putih yang dibeli dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT UGM). Mencit dipelihara dalam kandang 30 x 30 cm dengan 4 – 5 mencit tiap kandang. Mencit diberikan pakan standard dan minum setiap hari. Perlakuan pada hewan coba sudah disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Aklimatisasi dan adaptasi hewan coba dilakukan selama 7 hari.

4.6.2 Thawing *P.berghei*

Sediaan pellet eritrosit terinfeksi *P. berghei* yang disimpan dalam *liquid nitrogen tank* bersuhu -135°C dicairkan dan disentrifugasi 2000 rpm 5 menit. Pellet dicuci 2x dan tambahkan medium RPMI sesuai kebutuhan.

4.6.3 Inokulasi *P.berghei*

Inokulasi dilakukan secara intraperitoneal (i.p.) sebanyak 10^7 parasit dalam 0.2 ml darah untuk mencit. Darah yang terinfeksi diambil sebanyak 10 μL dan dilakukan pengenceran $10^4 \times$ dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung eritrosit Naubauer sehingga diketahui jumlah eritrosit/ml darah dengan rumus $(N \times 5 \times 10^4 \times \text{pengenceran})$, dengan N adalah jumlah eritrosit. Selanjutnya, jumlah parasit mencit donor dihitung dengan mengalikan jumlah eritrosit/ml darah dengan persentase parasit dengan parasitemia. Jumlah parasit yang hendak diberikan sebesar 10^7 dalam 0.2 ml RPMI (Blazquez *et al.*, 2008).

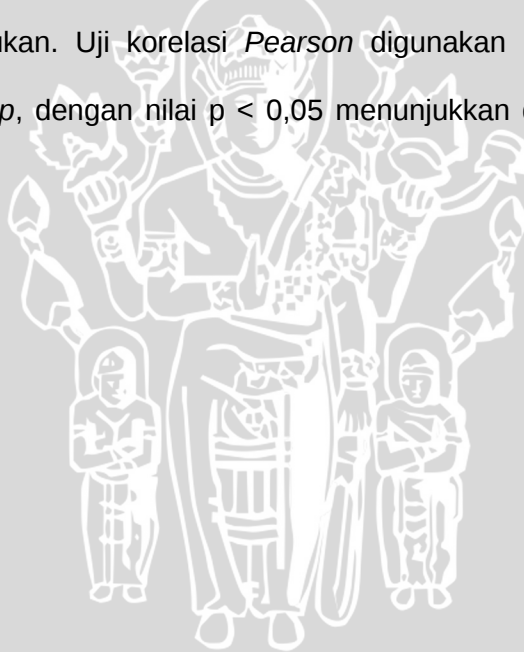
4.6.4 Western blot *Ubiquitin*

Sampel *Western blot* menggunakan darah mencit yang telah disentrifugasi untuk diambil pelletnya. Pellet hasil sentrifugasi dicuci dengan PBS dan diekstrak dengan menggunakan 0,15% saponin lysis, setelah itu dicuci dengan PBS yang berisi 20 mM NEM, 0,05 mM EDTA, 1 mM AEBSF, 0,02% Sodium Azide tanpa inhibitor cocktail. Protein kemudian diekstraksi dan sampel pellet parasit disonikasi dalam lysis buffer. Hasil dari sonikasi pellet diambil sebanyak 200 μ L dan ditambahkan lysis buffer, disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit, diambil supernatannya dan dipisahkan dalam eppendorf secara terpisah. Hasil supernatan tersebut kembali disentrifugasi 12000 rpm selama 15 menit. Hasil pellet (KP2, P2-1, P3-2, P1-4, KN) dari sentrifugasi kemudian dirunning dengan *Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil sentrifugasi sebelumnya yakni KP-4, P3-1, dan P2-4 juga dirunning. *Running* SDS-PAGE menggunakan *layout* : marker, KN1, KP2, P1-4, P2-1, P3-2, KP-4, P3-1, P2-4. Sebelum dilakukan running kembali, setiap pellet diberi Tris Cl 25 μ L dan *reduction sample buffer* (RSB) 25 μ L dengan perbandingan 1:1 dan dididihkan dalam *electric stove*. Setelah itu, semua sampel dipipetting dan dimasukkan ke dalam well elektroforesis untuk dielektroforesis selama 1 jam. Gel dari hasil elektroforesis diambil, direndam larutan ponceau, kemudian direndam di dalam skim milk. Wadah yang berisi skim milk dan gel kemudian dibiarkan *overnight* dalam *water bath*. Setelah dibiarkan *overnight* di dalam *water bath*, gel dibilas dengan TBS-Twin 0,05%. Kemudian, gel diinkubasikan dalam antibodi primer *anti-Ubiquitin* yang dilarutkan TBS-kim 0.5% selama 2 jam, antibodi sekunder selama 1 jam, SA-HRP selama 1 jam suhu ruang, substrat DAB, hingga pada proses akhir dibilas dengan aquades. Pada

tiap akhir proses inkubasi antibodi dan substrat, gel selalu dibilas dengan TBS Tween 0,05%. Hasil gel *Western blot* ditransfer untuk dilihat hasilnya.

4.7 Analisis Data

Western blot Ubiquitin dilakukan setelah pembedahan mencit pada hari kelima terapi. Analisis data dilakukan melalui kuantifikasi optikal densitas dari hasil *Western blot* dengan menggunakan *Software ImageJ* dan pengolahan menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16 One way ANOVA* digunakan untuk mengetahui apakah ada efek bermakna dari treatment yang dilakukan. Uji korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui *dose effect relationship*, dengan nilai $p < 0,05$ menunjukkan data statistik yang signifikan.

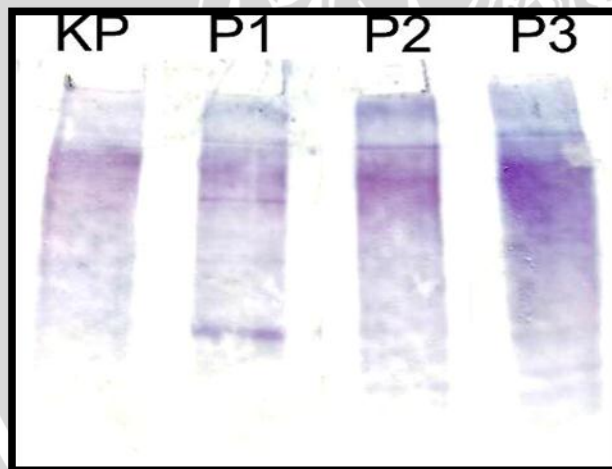


BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Western blot *Ubiquitin*

Sampel serum dari mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* dan telah diberi terapi ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* dirunning dengan menggunakan gel SDS-PAGE melalui metode *Western blot*. Adanya hambatan pada fungsi UPS menimbulkan gambaran poliubiquitinasi dengan terlihatnya *band* atau pita protein dengan berat molekul tertentu. Pada gambar 5.1 terlihat *band* protein tipis pada kelompok kontrol positif (KP) yang diberikan inokulasi *P. berghei* tanpa terapi, diikuti dengan peningkatan densitas *band* protein berturut-turut mulai dari kelompok perlakuan 1 (P1) hingga perlakuan 3 (P3).



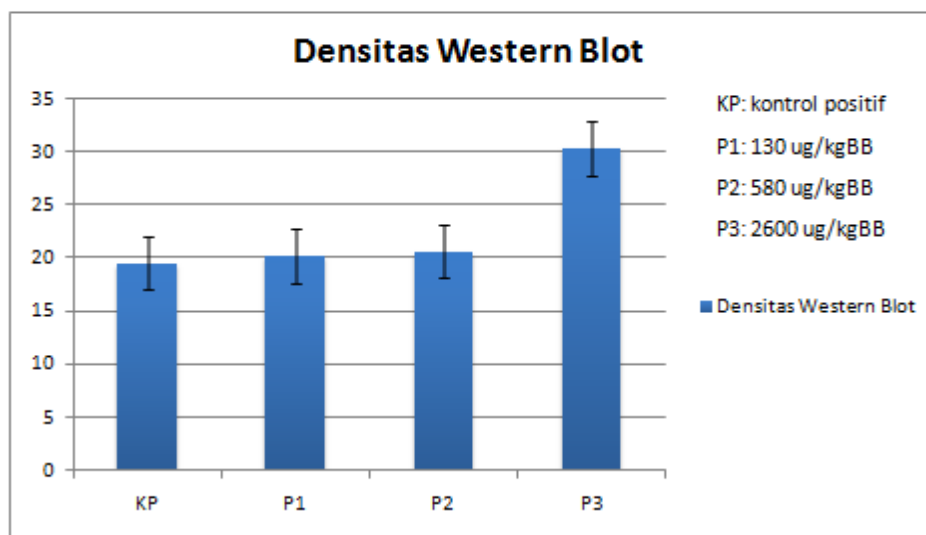
Gambar 5.1 Western blot Ubiquitin dari ekstrak protein *P.berghei*

Keterangan

KP:Kontrol Positif: P1:Perlakuan dosis 1: P2:Perlakuan dosis 2: P3:Perlakuan dosis 3

5.2. Densitometri Western blot Ubiquitin

Hasil *Western blot Ubiquitin* pada gambar 5.1 ditransfer dengan menggunakan *Office Scanner* dan kemudian dianalisis dengan *software ImageJ* untuk menghitung secara kuantitatif densitas *band* protein pada tiap kelompok perlakuan. Data kuantitatif densitas *band* protein terpoliubiquitinasi disajikan dalam grafik dan tabel berikut:



Grafik 5.1 Kuantifikasi hasil *Optical Density* (OD) *Western blot* protein parasit

Tabel 5.2 Hasil Densitometri *Western blot Ubiquitin*

No	Kelompok (n = 5)	Hasil Densitometri (OD)
1	KP (kontrol positif)	19.59
2	P1 (130 µg/kgBB)	20,278
3	P2 (580 µg/kgBB)	20,7
4	P3 (2600 µg/kgBB)	30,35

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Mekanisme Penghambatan UPS melalui Ubiquitin

Ubiquitin merupakan salah satu protein fungsional dengan berat molekul 8.5 kDa yang terdapat pada eukariot, termasuk protozoa parasit. Fungsi dari ubiquitin sendiri adalah berikatan dengan satu hingga lebih rantai protein yang kemudian akan didegradasi melalui proteasom, sehingga disebut *ubiquitin proteasome system (UPS)*. Kelangsungan dari UPS ini mutlak diperlukan organisme eukariot untuk proses transkripsi, siklus sel, diferensiasi, *DNA repair*, dan respon terhadap stres (Ponder *et al*, 2007). Sementara itu, sel eukariotik (termasuk *Plasmodium sp*) memiliki UPS non-lisosomal yang besar yang terdiri dari proteasom 26 S dan ubiquitin. *Ubiquitin Proteasome System* berfungsi untuk mengontrol regulasi proses sinyal protein suatu sel melalui regulasi dan degradasi dari *cyclin*, *cyclin dependent kinase*, *cyclin-dependent kinase inhibitor* selama mitosis, serta meregulasi ekspresi dari transkripsi gen dan progresi siklus sel. Seluruh fungsi ini terjadi melalui proses poliubiquitinasi, yakni penggabungan antara ubiquitin yang menjadi penanda protein untuk didegradasi oleh proteasom (Piwko, 2007; Aminake *et al.*, 2012).

Akumulasi dari protein terubiquitinasi dapat terjadi melalui penghambatan pada UPS oleh proteasome inhibitor, yakni eponemycin. Senyawa eponemycin di dalam metabolit ekstrak *Streptomyces hygroscopicus* yang merupakan peptida linear α',β' -epoxyketone (Sugiwaru *et al*, 1990) mampu berikatan dengan $\beta 1i$ dan $\beta 5i$ subunit proteasome 20S serta menginhibisi lokasi yang aktif pada proteasome dengan derajat tertentu (Meng *et al*, 1999). Subunit $\beta 1$, $\beta 2$, dan $\beta 5$

merupakan tiga dari cincin heptamerik pada 20S *core particle* (CP) yang aktif digunakan untuk proses proteolisis. Subunit $\beta 1$ menunjukkan aktivitas serupa dengan caspase, $\beta 2$ serupa dengan trypsin, sedangkan $\beta 5$ memiliki aktivitas *chymotrypsin-like* (Aminake *et al.*, 2011). Melalui penghambatan pada subunit $\beta 1i$ dan $\beta 5i$ yang merupakan bagian dari 20S *core particle* (CP) proteasome 20S, maka aktivitas proteolisis dapat terhambat. Aktivitas proteolisis yang terhambat akan menyebabkan akumulasi protein residu intraseluler yang kemungkinan dapat menyebabkan fragmentasi pada DNA dari parasit dan menyebabkan kematian dari parasit. Maka untuk menguji pengaruh *proteasome inhibitor* dalam ekstrak *S. hygroscopicus* terhadap lisat protein *P. berghei*, dilakukan analisis terhadap data hasil *Western blot Ubiquitin*.

Berdasarkan hasil *Western blot* secara kualitatif pada gambar 5.1 terlihat bahwa seiring dengan peningkatan dosis (P3), maka densitas protein terpoliubiquitinasi semakin meningkat. Pada kontrol positif (KP) yakni kelompok tanpa perlakuan dosis, tampak hanya sedikit akumulasi protein terpoliubiquitinasi yang ditandai dengan optikal densitas *Western blot* sebesar 19,59 OD. Pada grafik A dan B, terlihat ada sedikit peningkatan dengan kuantifikasi sebesar 20,278 dan 20,7, sedangkan pada P3 akumulasi terlihat lebih jelas meningkat dengan kuantifikasi sebesar 30,35 OD.

Dari uji normalitas *Shapiro-Wilk* terhadap data kuantifikasi *Western blot* (lihat lampiran 5) didapatkan hasil bahwa data terdistribusi dengan normal ($p > 0,05$) pada semua kelompok perlakuan. Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan karena sampel berjumlah kurang dari 50. Sedangkan, uji homogenitas data dengan *Levene's test* menghasilkan signifikansi sebesar 0,654 ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa belum terdapat perbedaan yang bermakna antar varian

kelompok perlakuan. Uji hipotesis komparatif dengan Kruskal-Wallis belum menunjukkan perbedaan yang bermakna di antara semua kelompok perlakuan ($p>0,05$). Kemudian, dilakukan uji korelasi *Pearson* agar menunjukkan hubungan antara densitas *Western blot* dan perlakuan yang diberikan. Pada hasil didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,968 ($p>0,01$) yang menunjukkan bahwa korelasi antara perlakuan dan densitas belum bermakna.

Hipotesis adanya perbedaan interpretasi hasil kuantitatif dan kualitatif dari *Western blot Ubiquitin* dimungkinkan karena pengaruh dari proses transfer data gel SDS-PAGE terhadap akuisisi atau kualitas data yang diperoleh menggunakan *Office Scanner* dan *ImageJ* untuk analisis densitas. Gassmann *et al* (2009) pada penelitiannya "*Quantifying Western blots: Pitfalls of Densitometry*" membandingkan 100 jurnal publikasi tentang hasil kuantifikasi dari *Western blot*. Dari analisis tersebut (Gassman *et al.*, 2009) didapatkan bahwa kualitas *Office Scanner* lebih rendah daripada *Charged Coupled Device (CCD) Camera* dalam proses scanning gel hasil elektroforesis sehingga terdapat perbedaan *peak volume* dari *band* yang dihasilkan. Selain itu, perubahan *background* pada *image* sebelum dianalisis dengan software *ImageJ* juga mampu mempengaruhi korelasi dari data. Maka, kuantifikasi *Western blot* belum bisa menjadi petunjuk korelasi satu-satunya untuk menunjukkan hubungan antara variabel dengan perlakuan, dalam hal ini efikasi proteasome inhibitor dalam ekstrak metabolit *S. hygroscopicus* terhadap densitas protein terpoliubiquitinasi. Meskipun demikian, adanya gambaran *band* protein *Western blot Ubiquitin* sudah mampu membuktikan proses poliubiquitinasi pada kelompok perlakuan.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak metabolit isolat bakteri *Streptomyces hygroscopicus* dapat meningkatkan kadar *Ubiquitin* pada mencit terinfeksi *P. berghei* secara kualitatif. Hal ini dibuktikan melalui hasil *Western blot Ubiquitin* yang meningkat dan berbeda antarkelompok perlakuan, yakni pada kontrol positif (KP) dengan optikal densitas sebesar 19,59, kelompok perlakuan dosis 1 (P1) dengan optikal densitas 20,278, kelompok perlakuan dosis 2 (P2) dengan optikal densitas 20,7, dan dosis 3 (P3) dengan optikal densitas sebesar 30,35. Berdasarkan Levene's test didapatkan bahwa distribusi data normal ($p > 0,05$), namun data belum berbeda secara signifikan yang ditunjukkan dengan nilai uji Kruskal-Wallis ($p > 0,05$) dan tidak didapatkan korelasi melalui uji *Pearson* ($p > 0,01$). Namun, diduga hal ini disebabkan karena adanya interferensi data kuantifikasi *Western blot* melalui metode transfer dan analisis densitometri.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan *range* dosis yang berbeda, agar didapatkan dosis optimal terapi, dosis letal, dan pengamatan terhadap efek samping dari terapi.
2. Pengukuran dengan metode *fluorescent* dapat digunakan sebagai metode pengecekan *ubiquitin* untuk mengukur efek pengobatan antimalaria yang menggunakan proteasome inhibitor secara kuantitatif.

3. Dalam proses kuantifikasi hasil dengan metode elektroforesis disarankan untuk menggunakan *CCD camera* dan *MCID software* untuk meminimalisasi interferensi data.



DAFTAR PUSTAKA

- Adam, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J. 1999. *Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents*. National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland.
- Alker PA, Mwapasa V, Purfield A, Rogerson SJ, Molyneux M.E, Kamwendo DD, Tadesse E, Chaluluka E, Meshnick SR. (2005) Mutation Associated with Sulfadoxine-Pyrimethamine and Chlorproguanil Resistance in *Plasmodium falciparum* Isolates from Blantyre, Malawi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sept., 49: 3919 -3921.
- Ahmadi, S. 2008. *Faktor Risiko Kejadian Malaria di Desa Lubuk Nipis Kecamatan Tanjung Agung Kabupaten Muara Enim*. Tesis tidak diterbitkan. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Ambarwati dan Gama, A.T. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 10 (2), 2009: 101 – 111
- Aminake, M.N., Arndt, H-D., Pradel, G. 2012. *The Proteasome of Malaria Parasite: A Multi-stage Drug Target for Chemotherapeutic Intervention*. Germany : Elsevier Ltd.
- Antonova-Nikolova, S., Tzekova, N. dan Yocheva, L., 2005, Taxonomy of *Streptomyces* sp. Strain 3B, *Journal of Culture Collection*, 4: 2004-2005, pp. 36-42.
- Blazquez, K., Moll, K., Ljungstrom, I., Petmann, H., Scherf, A., Wahlgren, M. 2008. *Thawing of glycerolyte frozen parasites with NaCl in Methodes in Malaria Research 5th*. BioMalPar, Paris. p. 15.
- Brooks, F.B., S.B., Janet. dan A.M., Stephen. 2004. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology 23rd Edition*. New York: The McGraw Hill Companies, Inc.
- Cayman cem. 2011. *Epoxomicin*. <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10007806>. Ann Arbor, Michigan, USA.
- Ceylan, Ozgur, Okmen Gulden dan Aysel Ugur. 2008. *Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria*. *EurAsian Journal of BioSciences EurAsia J BioSci* 2: 73-82.
- Czesny, B., Goshu, S., Cook, J.L., Williamson, K.C. 2009. *The Proteasome Inhibitor Epoxomicin Has Potent Plasmodium falciparum Gametocidal Activity*. American Society for Microbiology.

Delcros, J.G., Floc'h, M.B., Prigent, C., Arlot-Bonnemains, Y. 2003. *Proteasome Inhibitor as Therapeutic Agents: Current and Future Strategies*. France : Bentham Science Publishers Ltd.

Depkes RI, 2008.*Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.

Depkes RI, 2009.*Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.

Djimde,A.,Dumbo,O.K.,Cortese,J.F.,Kayentao,K.,Dumbo.S.,Diorte,Y.,Dicko,A., Su,Xz.,Nombra,T.,Fidock,DA,Wellem TE.,Plwe CV.,Coulibly,D. (2001). A molecular Marker For Chloroquine Resistant Falciparum Malaria. N.Engl J. 344:257-263

Duraisingh,M.T.,Cowman,A.F.(2005) Contribution of *pfmdr1* Gene to Antimalarial Drug Resistance. Acta Trop. 94(3) :181-190

Flavia Marinelli. 2009. *Antibiotics and Streptomyces: The Future of Antibiotic Discovery*. Microbiobiology Today.

Garner, P., Graves, P.M. 2005. The benefits of artemisinin combination therapy for malaria extend beyond the individual patient. PLoS Med 2(4): e105.

Gassmann M., Grenacher B., Rohde B., Vogel J. 2009. *Quantifying Western Blots: pitfalls of densitometry*. Electrophoresis.(11):1845-55. doi: 10.1002/elps.200800720.

Gillespie, S. dan Pearson, R.D. 2001. *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. London: John Wiley and Sons Ltd.

Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., and Duffy, P.E . 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication, *J Clin Invest*. **118** (4) : 1266–1276

Hasibuan, A.I.S. 2010.*Tingkat Pengetahuan Masyarakat terhadap Penyakit Malaria di Kecamatan Batang Serangan Kabupaten Langkat Provinsi Sumatera Utara*. Karya tulis ilmiah tidak diterbitkan. Meda: Universitas Sumatra Utara.

Igarashi, Y., Miura, S.S., Fujita, T., Furumai, T. 2006. *Pterocidin, a Cytotoxic Compound from the Endophytic Streptomyces hygroscopicus*. Japan: Pubmed.

Kublin,J.G.,Dzinjalama,F.KKmwendo,D.D.,Malkin,E.M.Cortese,JF.,Martino,L.M. ,Mukdam,RA (2002). Molekular Markers for Failure of Sufadoxin-Pyrimethmine and Chlorproguanil Dapsone Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. J.Infect.Dis 185:380-388

- Kunkel, D. 2008. *Filamentous soil bacterium (Streptomyces hygroscopicus)*. Daniel Kunkel Microscopy Inc.
- Marsh, Kevin. 2005. *Malaria, Molecular and Clinical Aspects : Clinical Features of Malaria*. KEMRI Centre for Geographic Medicine Research Coast, Kilifi, Kenya.
- Meng Lihao, Benjamin H. B. Kwok, Ny Sin et al. 1999. *Eponemycin Exerts Its Antitumor Effect through the Inhibition of Proteasome Function*. Cancer Res 1999;59:2798-2801.
- Methods Mol Biol. 2005;295:227-54. *Immunoblotting techniques*. Magi B, Liberatori S. Source Department of Molecular Biology, University of Siena, Siena, Italy.
- Mugittu, K., Genton, B., Mshinda, H and Beck H.P. (2006) Molecular Monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to Artemisinin in Tanzania. Malaria Journal 5:126
- Korn-Wendisch, F., & Kutzner, H. J. 1992. The Family Streptomycetaceae. In *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Second Edition. (A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, & Karl-Heinz Schleifer. Eds). Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, & Budapest.
- Kreindenweiss, A., Kremsner, P.G., Mordmüller, B. 2008. *Comprehensive Study of Proteasome Inhibitors Against Plasmodium falciparum Laboratory Strains and Field Isolates from Gabon*. University of Tübingen, Tübingen, Germany.
- Mc. Cutchan TF, Piper RC, Makler MT, 2008. Use of Malaria Rapid Diagnostic Test to Identify *Plasmodium knowlesi* Infection. Emerging Infectious Diseases 14:11.
- Nurkanto, Arif, Febrianti Listyaningsih, Heddy Julistiono dan Andria Agusta. 2010. *Eksplorasi Keanekaragaman Aktinomisetes Tanah Ternate Sebagai Sumber Antibiotik*. Jurnal Biologi Indonesia 6 (3): 325-339.
- Piwko, Wojciech. 2007. *Mechanism of Proteasome-Mediated Processing of Proteins*. Desertasi Fakultas Biologi, Universitas Ludwig-Maximilians, Munchen.
- Riskesdas RI, 2010. *Riskesdas 2010 : Malaria di Indonesia*. Tim Penyakit Menular dan Biomedis, SIMNAS VI, Jakarta.
- Prudhomme, J., McDaniel, E., Ponts, N., Bertani, S., Fenical, W., Jensen, P., Le Roch, K. 2008. *Marine Streptomyces: A New Source of Compounds Against the Human Malaria Parasite*. California: Plos ONE.

Rosenthal, P.J. 2003. Review Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *The Journal of Experimental Biology* **206** : 3735-3744
<http://jeb.biologist.org/cgi/reprint/206/21/3735>

Saadoun, I. & R. Gharaibeh. 2003. The Streptomyces flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotic-resistant bacteria. *J. Arid Environ* 53: 365 – 371.

Sembiring, L., Ward A. C. & Goodfellow, M. 2000. Selective Isolation and Characterisation of Members of the *Streptomyces violaceusniger* Clade Associated with the Roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78 (3-4) : 353-366.

Sembiring, L. 2002. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi untuk Mahasiswa S2*. Laboratorium Mikrobiologi. Fakultas Biologi. UGM, Yogyakarta.

WHO, 2010. *Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance : 2000 – 2010*. Geneva, Switzerland.

WHO, 2010. *Guidelines for The Treatment of Malaria – 2nd Edition*. Geneva, Switzerland.

Wichman, O., Muelhlberger, N., Jelinek, T., Alifrangis, M., Peyer, H. G., Muhlen, M., Grobusch, M., Gascon, J., et al. (2004) Screening for Mutation Related To Atovaquone-Proguanil Resistance in Treatment Failures and other Imported Isolates of Plasmodium Falciparum in Europe. *J. Infect Dis.* 90: 1541-1546

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G (1989) Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore, 2452-2492.

LAMPIRAN 1**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Nofi Nurina Ramadhani

NIM : 0910710019

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 1 Maret 2013

Yang membuat pernyataan

Nofi Nurina Ramadhani

NIM. 0910710019

LAMPIRAN 2

SURAT KEPUTUSAN PEKAN ILMIAH NASIONAL (PIMNAS)

KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOMOR : 207/SK/UN10.7/KM/2012

Tentang

PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PESERTA PIMNAS XXV DAN KOMPETISI NASIONAL TAHUN AKADEMIK 2011/2012

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

- Menimbang :
1. Bahwa untuk peningkatan atmosfer akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya perlu di tingkatkan kegiatan-kegiatan kemahasiswaan yang bernuansa akademis
 2. Bahwa dalam meningkatkan motivasi dan mendorong partisipasi para mahasiswa dalam kegiatan yang bernuansa tersebut perlu adanya penghargaan
 3. Sehubungan dengan hal tersebut diatas, perlu diterbitkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya tentang Pemberian Penghargaan Kepada Mahasiswa Berprestasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Peserta Pimnas XXV Dan Kompetisi Nasional Tahun Akademik 2011/2012
- Mengingat :
1. Undang-undang Nomor : 20 Tahun 2003 Tentang Sistem Pendidikan Nasional;
 2. Undang-undang No. 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi;
 3. Peraturan Pemerintah Nomor : 17 Tahun 2010 jo Nomor : 66 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan;
 4. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia No. 232/U/2000 tentang Pedoman Penyusunan Kurikulum Pendidikan Tinggi dan Penilaian Hasil Belajar Mahasiswa;
 5. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia No. 080/O/2002 tentang Statuta Universitas Brawijaya
 6. Keputusan Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 074/SK/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Brawijaya;
 7. Surat Keputusan Rektor Universitas Brawijaya No. 049/SK/2011 tentang Pemberhentian dan Pengangkatan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Periode 2011 – 2015
- Memperhatikan :
- Hasil pada PIMNAS XXV Tahun 2012 Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta yang diselenggarakan pada tanggal 09 - 12 Juli 2012 dan Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI yang diikuti para mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama Tahun Akademik 2011/2012

MEMUTUSKAN

- Menetapkan :
- Pertama :
- Memberikan Penghargaan kepada Mahasiswa anggota Tim PIMNAS dan peserta Kompetisi-kompetisi Tingkat Nasional Tahun 2012 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Tahun Akademik 2011/2012 yang susunan anggotanya seperti tercantum dalam lampiran Surat Keputusan ini.
- Kedua :
- Bentuk penghargaan berupa pembebasan para anggota Tim Mahasiswa dari kewajiban akademis pembuatan Karya Ilmiah Tugas Akhir regular, dengan tetap berkewajiban menyerahkan naskah karya ilmiah yang diikutinya oleh masing-masing mahasiswa.
- Ketiga :
- Memberikan nilai prestasi Akademis A pada Karya Ilmiah Tugas Akhir bagi setiap mahasiswa anggota TIM oleh karena capaian prestasi berskala nasional yang diperoleh pada PIMNAS XXV dan Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI pada Tahun Akademik 2011/2012.



- Keempat : Memberikan dana pembinaan kepada setiap kelompok dari Tim Mahasiswa sesuai dengan capaian prestasi pada PIMNAS XXV dan Kompetisi-kompetisi Nasional.
- Kelima : Menugaskan kepada lembaga-lembaga di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang terkait dengan ini untuk menindaklanjuti keputusan ini.

Ditetapkan di : Malang

Pada tanggal : 31 OCT 2012



Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA
NID. 195011161980021001

Tembusan :

1. Bapak Rektor Universitas Brawijaya;
2. Para Pembantu Dekan di Lingkungan FKUB;
3. Para Ka. Jur. dan KPS di Lingkungan FKUB;
4. Para Ka. Lab. di Lingkungan FKUB;
5. Presiden BEM FKUB;
6. Arsip





Telp. (0341) 551611 Pes. 213 214, 569117, 567192 - Fax. (0341) 564733
e-mail : sekr.fk@ub.ac.id http://www.fk.ub.ac.id

No	Nama Mahasiswa	NIM	Kegiatan	Tingkat Kegiatan	Prestasi Yang Dicapai
9	Adhi Satriyo Utomo Gayuh Anggita Wulansari Deddy Dwi Septian	0910714058 0910740032 105070400111033	PIMNAS XXV Tahun 2012 Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta (Presentasi PKM-P)	Nasional	Finalis
10	Annisa Al Karimah Nofi Nurina R Dyah Ayu Laksmi Alfian Wika C Rivo Yudhinata Brian Nugraha	0910710035 0910710019 105070100111104 105070107111037 0810710099	PIMNAS XXV Tahun 2012 Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta (Presentasi PKM-P)	Nasional	Finalis

Ditetapkan di : Malang
Pada tanggal : 31 OCT 2012



Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA
NIP. 195011161980021001

LAMPIRAN 3

SERTIFIKAT PEKAN ILMIAH NASIONAL (PIMNAS)



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
DIAGRAM PENGHAIRGAAN**

Nomor: 951/E/T/2012

Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia memberikan penghargaan kepada:

Nama	: Nof Nurita Ramadhani
Perguruan Tinggi	: Universitas Brawijaya
Bidang Kegiatan	: Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP)
Judul	: Actinomycetes Antimalarial Therapy (AAT) Agen Terapi Malaria Isolat Bakteria Actinomycetes pada Mencit Balb/c terinfeksi Plasmodium Berghoi Sebagai Inovasi Penanggulangan Resistensi Pengobatan Malaria

Atas peran sertanya dalam rangka mengikuti "PEKAN ILMIAH MAHASISWA NASIONAL (PIMNAS) XXV" pada tanggal 9-14 Juli 2012 yang diselenggarakan oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian dan Kebudayaan bekerjasama dengan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta sebagai:

PESERTA



Direktur Jenderal
Prof. DR. Ir. Djoko Santoso, M.Sc.
NIP. 195309098 197803 1 003

LAMPIRAN 4

LOGBOOK KEGIATAN PENELITIAN

Waktu Kegiatan	Kegiatan
23 Januari 2012	Pembagian penanggungjawab tugas Pendataan keperluan alat dan bahan
6 Maret 2012	Persiapan kandang hewan coba di Laboratorium Parasit
9 Maret 2012	Persiapan pembelian bakteri <i>S. hygroscopicus</i> di LIPI Perizinan laboratorium: Mikrobiologi (untuk persiapan bakteri); Parasit (pemeliharaan hewan coba); Biomedik (pengolahan sampel); LSIH
19 Maret 2012	Pembelian bahan pembiakan bakteri <i>S. hygroscopicus</i> di MIPA UB
26 Maret 2012	Pengecekan pengecatan gram hasil kultur bakteri
27 Maret 2012	Fermentasi inokulum bakteri di Laboratorium Biokimia
28 Maret 2012	Pengecatan gram bakteri, pembuatan Casein Broth, fermentasi, penghitungan koloni bakteri (dalam CFU) untuk difermentasikan
29 Maret 2012	Pengambilan koloni hasil fermentasi
30 Maret 2012	Spektrofotometri inokulum, streaking bakteri di plate
10 April 2012	Pembelian pakan mencit, persiapan kandang dan sekam
11 April 2012	Mencit datang, pemilihan sistem random sampling
13 April 2012	Ekstraksi ISP

19 April 2012	Mengeringkan ekstrak metabolit di laboratorium Farmakologi, membuat fermentasi lagi
21 April 2012	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metabolit di UMM
26 April 2012	Cek parasitemia mencit donor (Giemsa staining)
7 Maret 2012	Cek parasitemia mencit perlakuan post terapi
10 Mei 2012	Penyuntikkan parasit ke-5, cek parasitemia, pembelian bahan bedah
11 Mei 2012	Pembedahan mencit, pengambilan sampel darah untuk pengecekan <i>Western blot Ubiquitin</i>



LAMPIRAN 5

ANALISIS DATA STATISTIK (SPSS 16)

Uji Normalitas Data

Tests of Normality							
Grup		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
WB	Kontrol positif	.205	5	.200 [*]	.968	5	.864
	130 ug/kgBB	.265	5	.200 [*]	.882	5	.319
	580 ug/kgBB	.341	5	.058	.807	5	.092
	2600 ug/kgBB	.315	5	.116	.743	5	.026

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

WB			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.552	3	16	.654

ANOVA

WB					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.803	3	1.934	.139	.935
Within Groups	222.861	16	13.929		
Total	228.663	19			

Kruskal-Wallis

Ranks

Grup	N	Mean Rank
WB Kontrol positif	5	11.80
130 ug/kgBB	5	9.40
580 ug/kgBB	5	10.00
2600 ug/kgBB	5	10.80
Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	WB
Chi-Square	.463
df	3
Asymp. Sig.	.927

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grup

Correlations

[DataSet1] C:\Users\acer\Desktop\WB-transform.sav

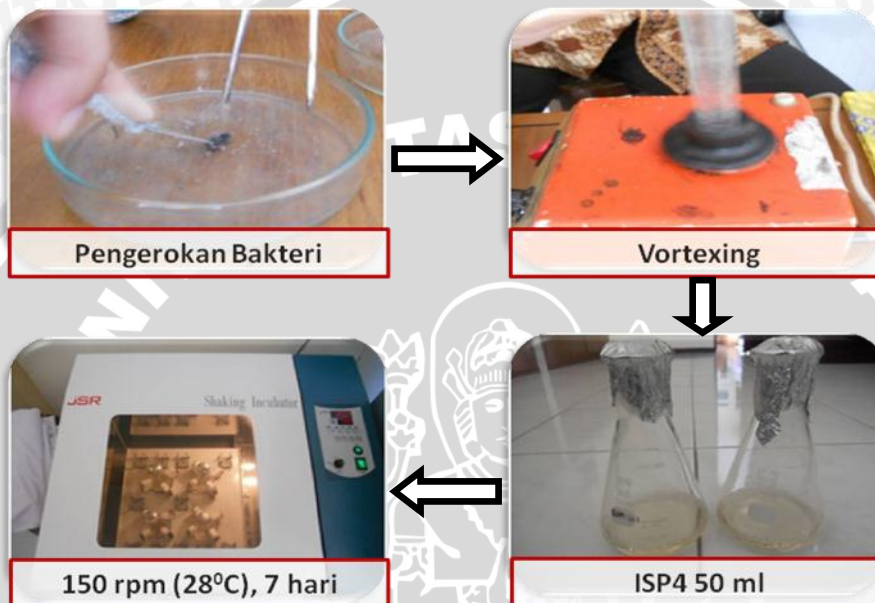
Correlations

		Grup	WB
Grup	Pearson Correlation	1	-.010
	Sig. (2-tailed)		.968
	N	20	20
WB	Pearson Correlation	-.010	1
	Sig. (2-tailed)	.968	
	N	20	20

LAMPIRAN 6

PROSEDUR PENELITIAN

A. Persiapan ekstrak metabolit *S. hygroscopicus*



B. Proses Ekstraksi Metabolit



C.
aklimatisasi hewan coba

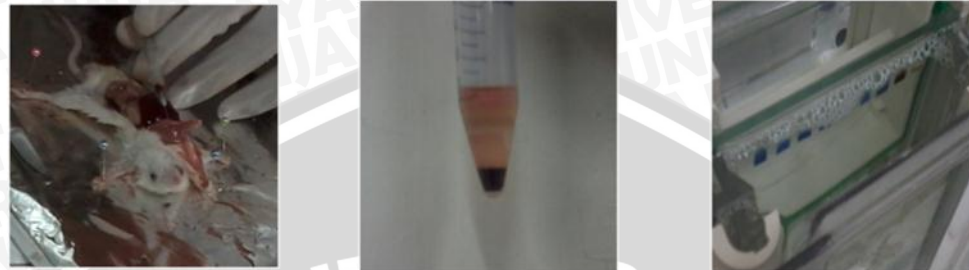


Pengelompokan dan

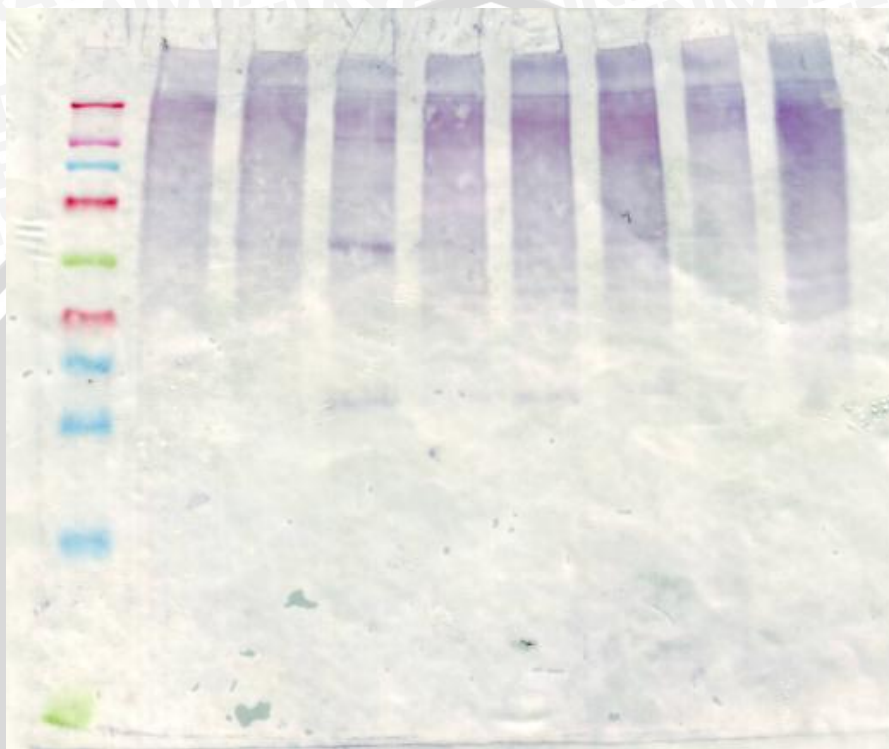
D.
coba dan pengambilan sampel darah intrakardiak



E. Western Blot Ubiquitin



LAMPIRAN 7
HASIL WESTERN BLOT



LAMPIRAN 8

FORMULIR KELAIKAN ETIK (*Ethical Clearance*)



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 056 / EC / KEPK-S1- JK/ 02 / 2012

Setelah Tim Etik Penelitian Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan :

Judul : *Actinomyces* Antimalaria Terapi (AAT) : Uji Aktivitas Antimalaria Isolat *Actinomyces* pada Mencit Balb/C sebagai Inovasi Terapi Eradikasi *Plasmodium falciparum* Resisten ACT

Peneliti : Annisa Alkarimah NIM : 0910710035
Nofi Nurina R NIM : 0910710006
Dyah Laksmi NIM : 105070100111104
Alfian Wika C NIM : 105070107111037
Rivo Yudhinata Brian Nugraha NIM : 0810710099

Unit / Lembaga : Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Tempat Penelitian : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Malang, 27 FEB 2012



Koordinator Divisi I

Prof. Dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpParK
NIP. 19520410 198002 1 001

LAMPIRAN 9

SURAT KETERANGAN PEMBELIAN MENCIT



UNIVERSITAS GADJAH MADA

**LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
(LPPT – UGM)**

Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan

Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM

Telp. (0274) 7497705, FAX. (0274) 546868, e-mail: lppt_info@mail.ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN
NO : 221/LP3HP/30 - III/2012

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.
NIP : 19601012 198703 2 001
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : Alfian Wika C.
NIM : 105070107111037
Instansi : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Pada bulan April 2012 membeli mencit putih (*Mus musculus L.*)
Jantan Galur Balb/c usia 2 bulan sejumlah 40 (Empat puluh) ekor dari
Unit Pra-klinik - LPPT Universitas Gadjah Mada

Hewan tersebut dalam keadaan masih Fertile dan tidak terinfeksi
penyakit sehingga tidak menularkan penyakit.
Menurut keterangan dari yang bersangkutan, Hewan tersebut akan
dibawa ke Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan
akan digunakan sebagai hewan percobaan penelitian.

Demikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan
sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik di ucapkan terima kasih.

Kogyakarta, 30 Maret 2012
Kabid Unit Pra-Klinik,

Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.
NIP. 19601012 198703 2 001

LAMPIRAN 10

SURAT KETERANGAN PEMBELIAN BAKTERI DARI LIPI

S2

Pihak : KEMENTERIAN
 Mende : Pendidikan dan Kebudayaan
 Nomor : A/100/2012/PPMOC

LIPIC Microbial Collection (LIPIMC)
BIDANG MIKROBIOLOGI, PUSAT PENELITIAN BIOLOGI-LIPIC
 Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46, Cibinong 16911, Indonesia
 Telp. 021-8765066/7, Fax. 021-8765062, HP. 08815301959
 Email: lipic@igya.com

PERMOHONAN PEMBELIAN KULTUR LIPIMC

Kepada Yth.

Kepala Bidang Mikrobiologi,
Pusat Penelitian Biologi, LIPI

1. Dengan ini kami menyatakan setuju dengan semua aturan yang tertera dalam "Perjanjian Instruksi dan Penanganan Kultur LIPIMC".

TANDA TANGAN : _____ TGL : 19 - 3 - 2012

2. Kultur LIPIMC akan digunakan untuk :
Penyakit Kanker dan Malaria (Pm) Rongga Hidung dari 2012

Bersama ini kami :

Nama : Negi Nanda R. Satrio
 Nama Institusi : Universitas Padjadjaran
 Alamat : Malang Jaya Timur
 Telp / Fax : 081352648323
 E-mail : _____

bermaksud membeli kultur LIPIMC dengan spesifikasi sebagai berikut :

No	LIPIMC No.	Nama Mikroorganisme	Jumlah
1	-	<i>S. hamolyticus</i> ssp. <i>hamolyticus</i>	1
2			
3			
4			
5			
6			

Cibinong, 19 - 3 - 2012

Mengetahui,
Kepala Bidang Mikrobiologi

W. Manager LIPIMC

Tanda tangan pemohon, asw

G. Adnan Darto, MSc
 NIP. 1914908199331003

K. Nanda R. Satrio
 NIP. 199803282009021001

(Negi Nanda R.)

LAMPIRAN 11

SERTIFIKAT HPLC ANALOG EPONEMYCIN PADA EKSTRAK METABOLIT *Streptomyces hygroscopicus*



UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU

RDP/5.10.01/LPPT
Rev. 1
Halaman 1 dari 1

LAPORAN HASIL UJI
Nomor : 7022/LPPT-UGM/U/IX/2012

Laporan hasil pengujian dibuat untuk :

Nama : Alfian Wika Cahyono

Alamat : Universitas Brawijaya Malang

Nomor sampel : 162-06-002-9368

Nama sampel : Ekstrak S. Hygroscopicus

Jumlah sampel : 2

Parameter uji : Dyhidroeponemycin

Metode : Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC)

Tanggal terima sampel : 19 September 2012

Tanggal pengujian : 24 September 2012

HASIL UJI

Parameter uji	Hasil		Satuan
	BAR	ABAR	
Dyhidroeponemycin	5,80	3,68	%

Yogyakarta, 28 September 2012
Manajer Teknik,

Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt.