

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK METANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)
DAN ARTEMISIN TERHADAP PENURUNAN INDEKS NEKROSIS HEPATOSIT
PADA MENCIT GALUR BALB/C YANG DIINFEKSI *Plasmodium berghei***

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

SILVY SICILIA AHLIawan

105070100111048

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Peruntukan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xii
Daftar Tabel	xiv
Daftar Lampiran	xv
Daftar Singkatan	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik	5
1.4.2 Manfaat Aplikatif	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Definisi dan Epidemiologi Malaria	6
2.2 Etiologi Malaria	7



2.2.1 Plasmodium Berghei	7
2.3 Siklus Hidup Plasmodium	7
2.3.1 Siklus Hidup Eksoeritrosit Plasmodium pada Manusia	8
2.3.2 Siklus Hidup Eritrositik Plasmodium pada Manusia	10
2.3.2.1 Perubahan Erotrosit pada Malaria	11
2.3.3 Siklus Hidup Seksual pada Anopheles	13
2.4 Respon Hepar terhadap Malaria	13
2.5 Mikroskopis Hepar pada Malaria	15
2.5.1 Nekrosis Hepatosit pada Malaria	16
2.6 Terapi dan Resistensi Obat anti Malaria	19
2.6.1 Terapi Anti Malaria	19
2.6.2 Resistensi Pengobatan Malaria	22
2.7 Kelor	23
2.7.1 Nutrisi Daun Kelor	25
2.7.2 Hubungan Kelor dengan Nekrosis Hepatosit	28
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	31
3.1 Kerangka Konsep	31
3.2 Hipotesis Penelitian	33
BAB IV METODE PENELITIAN.....	34
4.1 Rancangan Penelitian	34
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	34
4.3 Binatang Coba	34
4.3.1 Binatang Coba, Obyek, dan Teknik Randomisasi	34
4.3.2 Kriteria Inklusi	35
4.3.3 Kriteria Eksklusi	35



4.3.4 Estimasi Jumlah Pengulangan	35
4.4 Variabel Penelitian	36
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	37
4.5.1 Inokulasi Plasmodium berghei	37
4.5.2 Pemberian Artemisin dan ekstrak daun kelor	37
4.5.3 Pengukuran Parasitemia	37
4.5.4 Pengukuran hiperplasia kupffer	37
4.6 Definisi Operasional	38
4.7 Prosedur Penelitian	39
4.7.1 Thawing isolat Plasmodium berghei	40
4.7.2 Inokulasi Plasmodium berghei	40
4.7.3 Pengukuran Derajat Parasitemia	41
4.7.4 Pengukuran Nekrosis Hepatosit	41
4.7.5 Penghitungan Index Nekrosis Hepatosit	42
4.8 Pengolahan dan Analisis Data	42
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	45
5.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data	45
BAB VI PEMBAHASAN	60
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	67
Daftar Pustaka	69
Lampiran	75
Keterangan Kelaiakan Etik	89
Pernyataan Keaslian Tulisan	90

ABSTRAK

Ahliawan, Silvy Sicilia. 2013. **Pengaruh Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dan Artemisin terhadap Penurunan Indeks Nekrosis Hepatosit pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei***. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr Tinny Endang Hernowati, SpPK (K) (2) dr. Rachmad Sarwo Bekti

Hepar merupakan organ penting dalam respon imunitas tubuh terhadap parasit Plasmodium. Perubahan histopatologi pada hepar akibat malaria adalah nekrosis hepatosit dan merupakan salah satu indikator kuat terjadinya kerusakan hepar. ACT (Artemisin-based Combination Therapy) merupakan pengobatan paling efektif terhadap malaria, namun telah ditemukan resistensi di berbagai wilayah dunia dan terjadi efek samping yang tidak diinginkan. Sementara itu daun kelor (*Moringa oleifera*) yang bersifat schizonticidal dan mengandung flavonoid sebagai antioksidan dapat digunakan sebagai obat pendamping alternatif bersama artemisin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektifitas pemberian kombinasi artemisin dan ekstrak metanol daun kelor dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit mencit yang diinfeksi *P. berghei*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan *post test control group design* di mana subyek dibagi menjadi 6 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 5 mencit. Kelompok I yaitu mencit yang tidak diinfeksi *P. berghei* (kontrol negatif), kelompok II mencit diinfeksi *P. berghei* (kontrol positif), kelompok III mencit diinfeksi *P. berghei* dan diberi artemisin 0,04 mg/gBB, sedangkan kelompok IV sampai VI, mencit diinfeksi *P. berghei* dan diberi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor dengan 3 dosis yang berbeda (dosis I 0,125 mg/gBB, dosis II 0,25 mg/gBB, dan dosis III 0,5 mg/gBB). Hasil pengukuran jumlah nekrosis hepatosit berbeda signifikan antara mencit kontrol positif dengan perlakuan artemisin dan 3 dosis kombinasi (ANOVA, $p < 0,05$) sedangkan indeks nekrosis hepatosit antara mencit kontrol negatif dengan perlakuan dosis kombinasi II memberikan hasil tidak ada beda (ANOVA, $p > 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan artemisin dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c yang diinfeksi *P. berghei* dan dosis efektifnya adalah dosis kombinasi II.

Kata kunci: Nekrosis Hepatosit, Ekstrak Metanol Daun Kelor, Artemisin

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

ABSTRACT

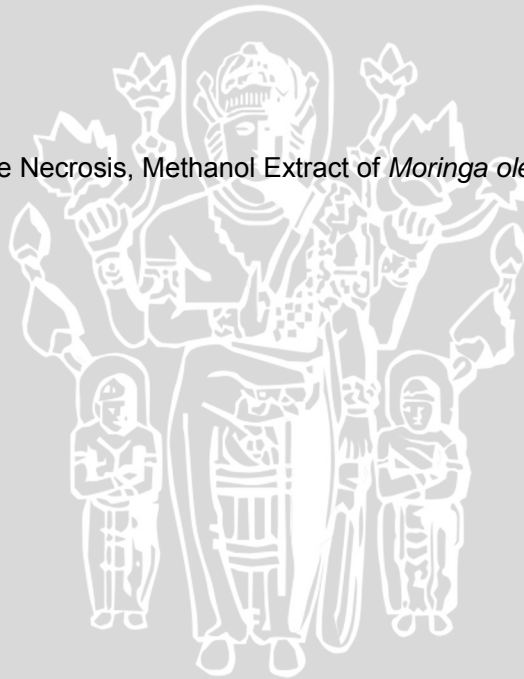
Ahliawan, Silvy Sicilia. 2013. **The Effect of Combination Methanol Extract of *Moringa oleifera* and Artemisin Towards Index of Hepatocyte Necrosis in *Plasmodium berghei* Infected Mice.** Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) Dr. dr Tinny Endang Hernowati, SpPK (K)

(2) dr. Rachmad Sarwo Bekti

Liver is an important organ in the host responses against plasmodium parasites. Histopathological changes of the liver due to malaria is hepatocyte necrosis which is one of strong indicators of liver damage. ACT (Artemisinin-based Combination Therapy) is the most effective treatment against malaria, but its resistance has been found out in various regions of the world and the side effects are undesirable. Meanwhile, the leaves of Moringa (*Moringa oleifera*) which is schizonticidal and contains flavonoids as antioxidants can be used as an alternative combination drug with artemisin. The aim of this study was to determine the effectiveness of the combination between artemisin and moringa leaf methanol extract in decreasing index of hepatocyte necrosis of the mice that is infected with *P. berghei*. This study was an experimental study using a post-test control group design in which subjects were divided into 6 groups. Each group consisted of 5 mice. Group I mice were not infected with *P. berghei* (negative control), group II mice were infected with *P. berghei* (positive control), group III mice were infected with *P. berghei* and given artemisin 0.04 mg/gBW, whereas group IV to VI, mice were infected with *P. berghei* and given

combination of artemisin 0.04 mg/gBW and moringa leaves with 3 different doses (dose I 0.125 mg/gBW, dose II 0.25 mg/gBW, and dose III 0.5 mg/gBW). The index of Hepatocyte necrosis measurement results differ significantly between the positive control and treated mice artemisin and 3 dose combinations (ANOVA, $p < 0.05$), while the same index of hepatocyte necrosis between the negative control mice and combination treatments II (ANOVA, $p > 0.05$). The conclusion is the combination of methanol extract of moringa leaves and artemisin can reduce the index of hepatocyte necrosis of *P. berghei* infected mice and the effective dose is combination dose II.

Keywords: Hepatocyte Necrosis, Methanol Extract of *Moringa oleifera*, Artemisin



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit protozoa intraseluler genus plasmodium yang ditransmisikan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Parasit malaria ini menyerang eritrosit dan ditandai dengan ditemukannya bentuk aseksual di dalam darah pejamu (WHO,2010). Insiden malaria di Indonesia adalah sebesar 6 juta kasus setiap tahun dengan angka mortalitas 700 kasus setiap tahunnya. Daerah endemik malaria di Indonesia mulai meluas di daerah Indonesia bagian timur (Maluku, Nusa Tenggara, Papua) dan pesisir Jawa bagian selatan dan diperkirakan semakin banyak penduduk yang hidup di daerah endemik malaria. (Dale P. *et al.*, 2005; Elyazar I.R.F, 2011).

Plasmodium penyebab malaria yang ada di Indonesia terdapat beberapa jenis yaitu *Plasmodium falcifarum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* dan *Plasmodium knowlesi* (Figtree M. *et al.*, 2010). Berdasarkan data riskesdas 2010, plasmodium falsifarum merupakan plasmodium terbanyak yang menyerang masyarakat Indonesia dengan presentase sebesar 84,6%, sedangkan yang kedua adalah plasmodium vivax sebanyak 6,9% (Depkes RI, 2009).

Infeksi malaria pada manusia berawal pada saat nyamuk *Anopheles* betina menginokulasi sporozoit yang terdapat pada saliva saat menggigit manusia. Sporozoit ini akan masuk secara cepat dalam aliran darah menuju ke hati. Di hati parasit menyerang sel parenkim hati dan memulai periode reproduksi aseksual. Pada hati sporozoit akan memperbanyak diri (fase intrahepatik atau

preeritrosit skizogoni atau merozoit). Satu sporozoit dapat memproduksi 10.000-30.000 merozoit (Sudoyo, 2009).

Hepar adalah organ yang penting dalam respon parasitemia malaria karena hepar adalah organ utama yang terlibat dalam reproduksi aseksual parasit malaria dan karena aktivitas parasit dan respon imun host dapat menyebabkan inflamasi kronik pada hepar (Pan M.H. *et al.*, 2010). Studi histologi nekrosis hepar merupakan indikator yang kuat untuk mengungkapkan kerusakan hepar akibat parasit malaria dan efek obat dalam mengurangi kerusakan tersebut (Soniran, 2011). Nekrosis pada sel hepar berhubungan dengan adanya metabolik perusak yang mengakibatkan deplesi ATP. Pada stadium awal dari fase ekso-eritrositik di hepar, parasit dalam bentuk sporozoit menginfeksi dan bermigrasi di hepar. Migrasi sporozoit tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel hepar, yang dapat ditunjukkan pada meningkatnya enzim alanin transaminase (ALT). Sebagai respons terhadap kerusakan sel-sel hepar maka polimorfonuklear sel (PMN) akan mengaktifkan sel kupfer dimana sel kupfer tersebut akan secara aktif berproliferasi merusak sel darah merah yang ruptur karena adanya aksi fagositik (Soniran, 2011). Aksi dari sel kupffer yang berlebih tersebut akan menghasilkan Reactive Oxygen Species (ROS) yang akan merusak jaringan melalui kemampuannya untuk mendegradasi membran lipid dan atau protein. Sedangkan pada fase eritrositik nekrosis sel hepar juga dapat terjadi akibat sekuestrasi yang berada pada vena porta dan arteri hepatika. Akibat sekuestrasi tersebut akan terjadi peningkatan Fe^{2+} yang dilepaskan eritrosit. Hal ini akan menyebabkan iskemia/reperfusi yang dapat menyebabkan deplesi ATP dan selanjutnya menyebabkan nekrosis hepatosit (Nines. I.N, *et al*, 2013).

Peningkatan resistensi obat-obatan yang ada merupakan salah satu penyebab tingginya angka morbiditas dan mortalitas akibat malaria. Dengan banyaknya kasus resistensi obat malaria maka Depkes menggunakan regimen baru yaitu artemisin dan derivatnya sebagai obat pengganti pada malaria yang resisten klorokuin. Obat ini bekerja dengan menghambat enzim ATPase dan menghasilkan radikal bebas untuk mengeliminasi parasit penyebab malaria (WHO,2010). Akan tetapi penggunaan golongan artemisinin secara monoterapi akan mengakibatkan rekrudensi (relaps jangka pendek), oleh karena itu WHO memberikan petunjuk penggunaan artemisinin dengan mengkombinasikan dengan obat antimalaria lain, sehingga disebut *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT). Namun resistensi terhadap ACT juga telah dilaporkan pada beberapa kasus yaitu terhadap 4 Aminokuinolin (Klorokuin dan Amodiaquin) diberbagai wilayah dunia (PAPDI,2009).

Mengingat kejadian penting yang menandai patogenesis malaria berat adalah hiperaktivasi sistem imun dengan produksi sitokin proinflamasi yang berlebih, dan meningkatnya radikal bebas, maka berbagai macam upaya saat ini telah dikembangkan untuk menurunkan derajat beratnya penyakit. Hal ini memotivasi munculnya berbagai penelitian terhadap bahan-bahan baru dalam upaya meningkatkan respon imun dan menurunkan radikal bebas dalam tubuh selama infeksi malaria (Junqueira, 2007). Ketertarikan tersebut terutama pada sumber-sumber alami atau herbal seperti tanaman yang tumbuh di sekitar tempat tinggal penduduk di daerah endemik malaria.

Kelor (*Moringa oleifera*) adalah spesies monogenarik famili *moringaceae* yang paling banyak ditanam, merupakan tanaman asli di India sub-Himalaya, Pakistan, Bangladesh, dan Afganistan (Fahey, 2005). Ekstrak daun

dari tanaman tropis *Moringa oleifera* telah dibuktikan mempunyai efek antioksidan dan antiinflamasi secara invitro, terutama dihasilkan oleh kandungan senyawa flavonoidnya yaitu *quercetin*. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang penting yang terdapat dalam *Moringa oleifera*. Flavonoid berperan penting sebagai antioxidant, antiinflamasi, antitumor, antiviral, dan imunomodulator (Oliveira J.E, 2002). Pada penelitian lain ditemukan bahwa kelor mengandung asam amino, kalsium, antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, dan senyawa polifenol, flavonoid serta zat-zat yang lain (Chumark, 2005).

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan artemisin akan memberikan efek sinergis dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terapi kombinasi artemisin dan ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ?
2. Berapa dosis efektif kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan artemisin dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan artemisin dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui dosis efektif kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan artemisin dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Menjadi dasar pengetahuan untuk memahami efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai terapi alternatif tambahan yang diberikan bersama pengobatan Artemisin pada pengobatan penyakit malaria.
2. Dapat memberikan tambahan pengetahuan tentang efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antimalaria dan antioksidan.
3. Dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut tentang mekanisme antimalaria dari daun kelor (*Moringa oleifera*).

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Dari hasil penelitian ini diharapkan ekstrak metanol daun Kelor (*Moringa oleifera*) dapat digunakan sebagai terapi pendamping obat antimalaria yang secara sinergis dapat menstimulasi peningkatan sistem imunitas saat terinfeksi malaria, sehingga dapat menurunkan dan mortalitas penderita malaria.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi dan Epidemiologi Malaria

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit protozoa intraseluler genus plasmodium yang ditransmisikan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Parasit malaria ini menyerang eritrosit dan ditandai dengan ditemukannya bentuk aseksual di dalam darah pejamu (WHO, 2010).

Malaria merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dengan insiden sebesar 6 juta kasus setiap tahun dengan angka mortalitas 700 kasus setiap tahunnya. Daerah endemik malaria di Indonesia mulai meluas di daerah Indonesia bagian timur (Maluku, Nusa Tenggara, Papua) dan pesisir Jawa bagian selatan. Diperkirakan semakin banyak penduduk yang hidup di daerah endemik malaria. (Dale *et al.*, 2005, Elyazar, 2011).

Insiden penyakit malaria berdasarkan API (*Annual Parasite Incidence*) yang merupakan upaya penanggulangan Malaria di Indonesia, terdapat kasus malaria 1,85 per 1000 penduduk pada tahun 2009, dengan API yang tertinggi adalah Papua Barat, NTT dan Papua serta terdapat 12 provinsi lain yang diatas angka API nasional. Namun penurunan angka tersebut belum memenuhi target Kementerian Kesehatan Tahun 2010-2014 yaitu untuk menurunkan angka kesakitannya dari 2 menjadi 1 per 1.000 penduduk. Sehingga masih harus dilakukan upaya efektif untuk menurunkan angka kesakitan 0,85 per 1000 penduduk dalam waktu 4 tahun, agar target Rencana Strategis Kesehatan Tahun 2014 tercapai (Depkes RI, 2009).

2.2 Etiologi Malaria

Malaria disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium*. Pada manusia *Plasmodium* terdiri dari 4 spesies, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium ovale*. Studi terbaru telah menemukan suatu spesies *Plasmodium* baru yang bisa menginfeksi manusia. Spesies *Plasmodium* yang kelima ini dikenali sebagai *Plasmodium knowlesi* yang ditemukan di kepulauan Borneo (Figtree M. *et al.*, 2010).

Kelima jenis *Plasmodium* penyebab malaria tersebut dapat ditemukan di Indonesia. Namun berdasarkan data Riskesdas 2010, 86,4% penyebab malaria di Indonesia adalah *Plasmodium falciparum*, dan *Plasmodium vivax* sebanyak 6,9%, sedangkan *Plasmodium ovale* dan jenis lain tidak dilaporkan (Depkes RI, 2009).

2.2.1 Plasmodium Berghei

Pada penelitian ini menggunakan *Plasmodium berghei* karena parasit tersebut memiliki kemiripan dengan *Plasmodium falciparum* dalam patogenesis terjadinya malaria. Pada infeksi oleh *Plasmodium berghei* dapat kita temukan adanya fenomena *cytoadherence*, *rosetting*, dan sekuestrasi dari eritrosit yang terinfeksi pada tikus coba, sama seperti efek yang ditimbulkan oleh infeksi *Plasmodium falciparum* pada manusia (Lou, 2001).

2.3 Siklus Hidup Plasmodium

Dalam daur hidupnya, *Plasmodium* mempunyai 2 hospes, yaitu manusia dan nyamuk. Siklus aseksual di dalam manusia di kenal sebagai skizogoni, sedangkan siklus seksual yang membentuk sporozoit di dalam nyamuk sebagai

sporogoni. Sporozoit yang aktif dapat ditularkan ke dalam tubuh manusia melalui saliva nyamuk, kemudian menempati jaringan parenkim hati dan tumbuh sebagai skizon (stadium ekso- eritrositik atau stadium pre-eritrositik). Sebagian sporozoit tidak tumbuh dan tetap tidur (dormant) yang disebut hipnozoit. Sel hati yang berisi parasit akan pecah dan terjadilah merozoit. Merozoit akan masuk ke dalam eritrosit (stadium eritrositik).

Malaria biasanya didapat dari gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang sebelumnya terinfeksi. Pada keadaan lain, malaria berkembang pasca penularan transplasenta atau sesudah transfusi darah yang terinfeksi, dimana keduanya melewati fase pre-eritrositik perkembangan parasit dalam hati (Dewi Ratna, 2011).

2.3.1 Siklus Hidup Eksoeritrositik *Plasmodium* pada Manusia

Ketika nyamuk *Anopheles* betina terinfeksi *Plasmodium* dan menggigit manusia, nyamuk tersebut menghisap darah dibawah kulit. Selama proses tersebut, nyamuk menginjeksi saliva yang berisi sporozoit sebagian besar ke dermis bukan langsung ke sirkulasi darah (Schwenk R.J and Richie T.L, 2011). Sporozoit tersebut kemudian bergerak menuju pembuluh darah terdekat ataupun saluran limfatik lalu menuju ke hepar . Pergerakan sporozoit melewati membran plasma dilakukan dengan gliding motility dan membentuk parasitophorus vacuole disekitar parasit (Mota M.M. *et al*, 2001).

Untuk mencapai hepar, parasit harus melakukan perjalanan keluar dari kulit ke dalam aliran darah dan kemudian menyeberangi endotelium hepar agar dapat mengakses hepatosit. Langkah ini didukung dengan adanya interaksi elektrostatis antara liver-specific cell surface *heparan sulphate proteoglycans*

(HSPGs) dan molekul permukaan parasit, seperti *circumsporozoite protein* (CSP) dan *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) (Liehl Peter, Mota M Maria. 2012). Menyebarnya CSP dan TRAP pada sel hepar dapat menghambat sintesis protein dan pendistribusian kembali ke perinuklear space. Sporozoit kemudian melewati sinusoid dan menginvasi hepatosit melalui 2 tipe sel yang berbeda yaitu sel endotelial secara langsung dan lewat sel kupfer yang merupakan makrofag yang spesialisasinya pada hepar. Pada sel kupfer, sporozoit membentuk vakuola parasitophorus untuk masuk ke sel kupfer tanpa terjadi fagositosis oleh sel kupfer itu sendiri (Frevort, 2004).

Secara signifikan, pada sinusoidal dan sel kupfer terdapat APC (*antigen presenting cells*) yang mempersentasikan MHC I dan II dan co stimulator molekul CD80 dan CD86 yang seharusnya mampu mempersentasikan CSP-derivat protein. Namun karena efek *ribotoxic* nya, translokasi CSP dapat mengganggu pemrosesan antigen tersebut. Sehingga sporozoit akan terus bermigrasi dan mengakibatkan inflamasi serta kerusakan pada hepatosit.

Sporozoit kemudian berkembang dan bereplikasi menjadi beribu-ribu eritrosit yang terinfeksi parasit yang disebut merozoit. Stadium asimtomatis pada hepar ini selesai ketika merozoit memenuhi vesikel yang disebut merozom yang kemudian dilepas pada aliran darah (Liehl and Mota, 2012). Inilah yang disebut dengan stadium pre-eritrositik atau ekso-eritrositik. Fasepreeritrositik berlangsung selama 2-3 minggu, tergantung pada spesiesnya. Pada *Plasmodium falciparum* berlangsung selama 9 hari tetapi pada *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* bisa melakukan dorman selama beberapa bulan hingga beberapa tahun yang disebut dengan stadium hipnozoit sebelum akhirnya matur dan melepas merozoit menuju ke aliran darah (John Wiley and Sons 2009).

2.3.2 Siklus Hidup Eritrositik Plasmodium pada Manusia

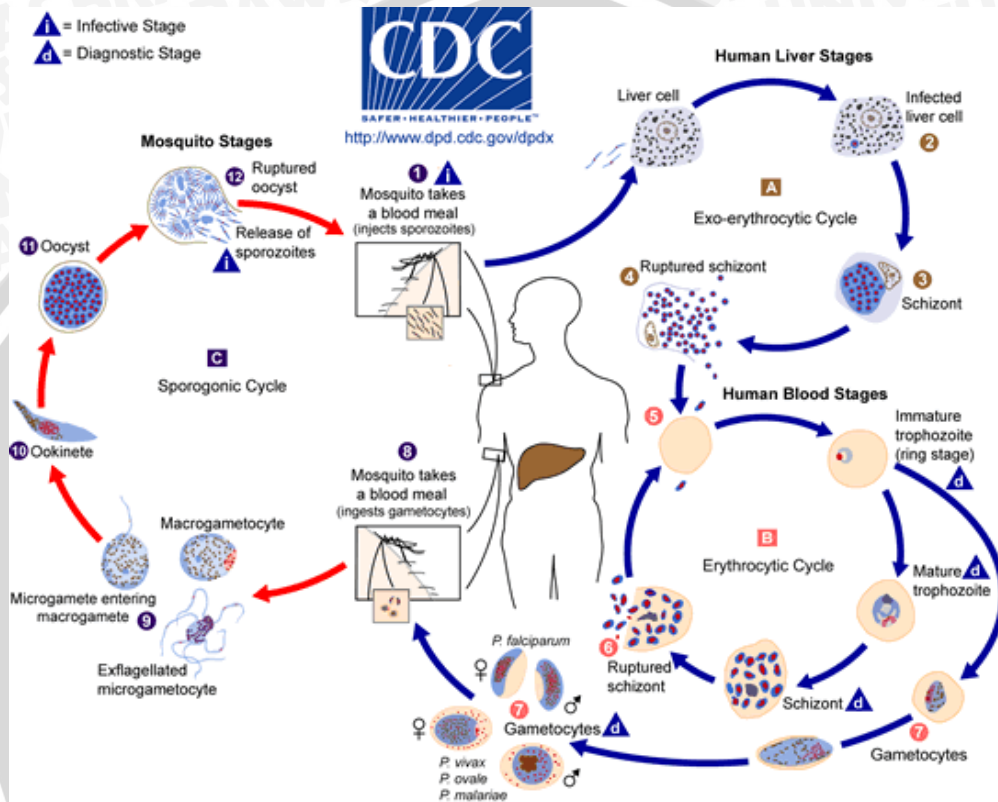
Setelah merozoit berada dalam sirkulasi darah. Pada saat ini parasit mulai menyerang eritrosit (sel darah merah) dan bermultiplikasi 6-20 kali setiap 48 sampai 72 jam. Pada saat parasit mencapai kepadatan sebesar $50/\mu\text{L}$ dalam darah, mulai tampak gejala. Pada *P. vivax* dan *P. ovale* parasit bentuk intrahepatik tidak membelah secara cepat tetapi dorman untuk periode tertentu mulai dari 3 minggu sampai 1 tahun atau lebih sebelum mulai bereproduksi. Bentuk dorman atau hipnozoit inilah yang menyebabkan relaps dan merupakan karakteristik pada kedua plasmodium ini (Sudoyo, 2009).

Merozoit akan segera menyerang eritrosit setelah masuk ke peredaran darah. Penempelan merozoit pada eritrosit dimediasi oleh reseptor spesifik di permukaan eritrosit. Pada *P. Vivax* reseptor ini berhubungan dengan faktor antigen *Duffy Fya* atau *Fyb*. Hal ini menyebabkan individu dengan golongan darah Duffy negatif resisten terhadap malaria vivax (Sudoyo, 2009).

Pada tahap awal perkembangan intraeritrosit, bentuk cincin kecil pada keempat plasmodium terlihat mirip di bawah mikroskop cahaya. Dengan perkembangan trophozoit karakteristik parasit menjadi jelas, seperti pigmen mulai terlihat, parasit menjadi ireguler atau ameboid. Pada akhir 48 jam siklus intraeritrosit (72 jam untuk plasmodium malariae), parasit hampir merusak semua hemoglobin dan menempati semua eritrosit. Pada saat ini disebut skizon, dan bila skizon pecah akan mengeluarkan 6-30 merozoit yang masing-masing dapat menyerang satu sel darah merah (CDC,2010).

Setelah satu siklus aseksual (pada *P. Falciparum*) atau segera setelah keluar dari sel hati (pada *P. Vivax*, *P. Ovale*, dan *P. Malariae*) beberapa parasit

berkembang menjadi bentuk gametosit dan apabila nyamuk menghisap darah manusia yang sakit akan terjadi siklus seksual dalam tubuh nyamuk (CDC,2010).



Gambar 2.1 Siklus Hidup Plasmodium pada Manusia (CDC,2010).

2.3.2.1 Perubahan Eritrosit pada Malaria

Setelah menginvasi eritrosit, merozoit akan tumbuh dan memakan protein intraseluler, terutama hemoglobin dan akan menghasilkan toksin berupa pigmen malaria (hemozin). Parasit juga mengubah membran eritrosit dengan cara mengubah sifat transportnya, memperlihatkan antigen permukaan dan memasukkan protein baru dari parasit. Bentuk eritrosit menjadi lebih ireguler, lebih antigenik dan kurang mampu melakukan deformasi (Kasper *et al.*, 2008).

Pada infeksi *P. falciparum*, timbul tonjolan pada permukaan membran pada akhir jam ke 24 siklus aseksual. Penonjolan ini disebut *knob*, yang merupakan varian antigen galur spesifik suatu protein perekat yang memediasi perlekatan dengan reseptor pada endotel venula dan kapiler (disebut *sitoadherens*). Beberapa reseptor vaskuler telah diidentifikasi dan interseluler adhesi molekul ICAM 1 merupakan reseptor yang sangat penting untuk otak, Kondroitin sulfat B pada plasenta dan CD36 pada kebanyakan organ. Pada stadium yang sama *P. falciparum* yang terinfeksi juga melekat pada eritrosit yang tidak terinfeksi membentuk rosete dan aglutinasi dgn eritrosit yang mengandung parasit. Proses *cytoadherent*, *rosetting*, dan aglutinasi ini merupakan inti dari patogenesis Malaria *falciparum*. Selanjutnya terjadi sekuesterasi eritrosit yang berisi bentuk matang parasit pada organ vital (terutama otak). Sekuester parasit ini terus berkembang di luar jangkauan mekanisme pertahanan, akibatnya hanya parasit aseksual dengan bentuk cincin yang lebih muda yang terlihat beredar di sirkulasi darah perifer pada malaria *falciparum*, dan tingkat parasitemia perifer tidak mewakili jumlah sebenarnya dari parasit di dalam tubuh. Malaria yang berat juga berhubungan dengan berkurangnya deformabilitas eritrosit yang tidak terinfeksi, dan umur eritrosit menjadi lebih pendek. Pada ketiga jenis malaria yang lain (*jinak*), sekuesterasi ini tidak terjadi dan semua tahapan pematangan parasit jelas tampak pada apusan darah tepi. *P. vivax*, *P. ovale*, dan *P. malariae* sering menunjukkan tingkat parasitemia jarang > 2%. *Plasmodium falciparum* dapat menyerang semua usia eritrosit dan mungkin sangat terkait dengan tingkat parasitemia yang tinggi (Kasper *et al.*, 2008).

2.3.3 Siklus Hidup Seksual pada Anopheles

Saat nyamuk betina menghisap darah, semua stadium yang ada pada darah akan masuk ke lambung nyamuk. Hanya bentuk Gametosit (makrogametosit dan mikrogametosit) yang dapat bertahan dan melanjutkan siklusnya. Kemudian terjadi pematangan gametosit menjadi gamet (makro dan mikrogamet). Mikrogamet dibentuk oleh suatu proses yang dikenal sebagai eksflagelasi yang akan berfertilisasi dengan makrogamet dan membentuk zigot.

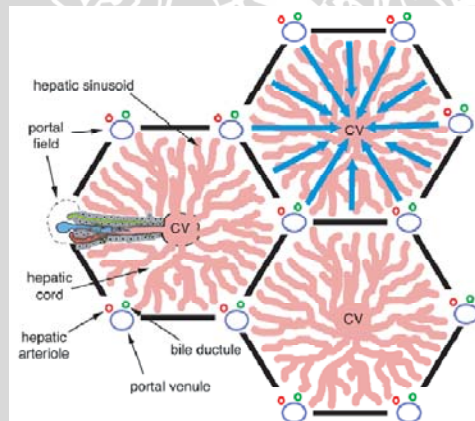
Zigot berkembang menjadi ookinet motil yang akan penetrasi ke dalam sel epitel usus dan berkembang menjadi ookista. Ookista bermultiplikasi dalam replikasi aseksual sehingga timbullah sporozoit. Rupturnya ookista matur menyebabkan pelepasan sporozoit menuju hemocoel (kavitas tubuh) dari nyamuk. Sporozoit kemudian bermigrasi dan menginvasi kelenjar saliva, dan siap untuk diinjeksikan ke dalam darah manusia ketika nyamuk Anopheles menggigit manusia (Natadisastra dan Agoes, 2009).

2.4 Respon Hepar terhadap Malaria

Hepar adalah organ yang penting dalam respon parasitemia malaria karena hepar adalah organ utama yang terlibat dalam reproduksi aseksual parasit malaria dan karena aktivitas parasit dan respon imun host dapat menyebabkan inflamasi kronik pada hepar (Pan M.H. *et al.*, 2010).

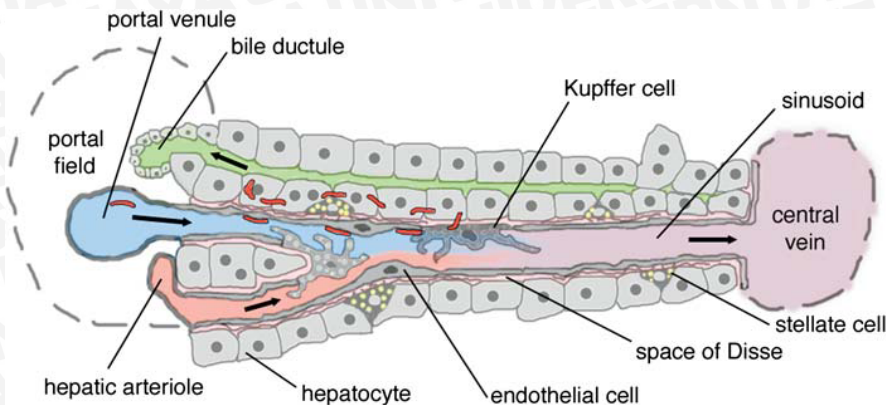
Infeksi malaria dimulai ketika sporozoit masuk ke sinusoid melalui vena porta/ arteri hepatica yang merupakan unit klasik hepar. Unit klasik dari parenkim hepar adalah lobulus hepar, yaitu struktur yang dikelilingi oleh jaringan ikat dan dibentuk oleh 6 kanal porta. Tiap porta terdiri dari satu cabang vena porta, arteri hepatica, dan saluran empedu. Vena porta mengandung darah dari vena

mesenterika dan limpa superior dan inferior. Arteri hepatica mengandung darah dari cabang coeliaca aorta abdominal. Saluran empedu membawa empedu yang disintesis oleh sel-sel parenkim (hepatosit). Dan akhirnya muara dari ketiga saluran tersebut bergabung dengan sporozoit melewati sinusoid di sepanjang hepatosit dan meninggalkan hepar melalui vena sentral. Lobul hepar terdiri dari hepatosit yang tersusun sebagai “interconnected plates”. Jarak antara plates membentuk sinusoid. Sinusoid dibatasi oleh sel endothel dan sel kupffer yang memiliki fungsi sebagai fagositik. Plasma dan protein bermigrasi melalui sel pembatas ini melalui mekanisme fenestrasi, yaitu dengan kontak langsung dengan hepatosit dan terjadi uptake nutrient serta oksigen oleh hepatosit. (Frevert U ,2004)



2.2 unit klasik hepar : Lobulus hepar (Frevert U,2004)

Setelah melewati sel kupffer maupun sel endotel, sporozoit akan keluar menuju space of Disse dan akan bermigrasi melalui beberapa hepatosit sampai akhirnya bermultiplikasi dan menjadi merozoit (Mota *et al*, 2001). Motilitas Parasit tersebut akan mempengaruhi respon imun karena dianggap sebagai antigen sehingga menyebabkan kematian sel (nekrosis hepatosit) sebelum bermultiplikasi menjadi merozoit (Frevert, 2005).



Gambar 2.3 Infeksi Sporozoit Plasmodium pada Hepar Manusia

(Frevert,2005)

2.5 Mikroskopis Hepar pada Malaria

Pada fixed liver section, ditemukan fokal necrosis pada hewan yang diinfeksi sporozoit intravena/oleh gigitan nyamuk. Sejumlah daerah kecil menunjukkan adanya nekrosis yang berasal dari *hydropic swelling* menjadi kematian sel dan pemisahan lengkap sel. Setelah 3 jam intravena inokulasi *P. berghei* dan 4 jam sampai 6 jam setelah inokulasi *P. yoelii*, dapat ditemukan berbagai stadium nekrosis sel death yang berada dalam intima berhunungan dengan granulosit dan mononuclear infamatory cel. Nekrosis pada hepatosit sangat bergantung pada infeksi sporozoit, hasil histopatologi menunjukkan bahwa sel-sel inflamasi menfiltrasi hati tikus yang terinfeksi *P. berghei* atau *P. yoelii* dalam waktu 40 jam post inokulasi, sesaat sebelum release merozoit. Prubahan dramatis ditunjukkan pada stadium lanjut pada hepatosit ditemukan sejumlah besar sel non parenchymal pada sinusoid setelah 7 hari infeksi.

Akibat transmigrasi sporozoit ke sel-sel hati menyebabkan ketidakcocokan antara parasit dengan sel inang serta adanya respon imun dari tubuh sendiri mengakibatkan terjadinya nekrosis hepatosit (Aidoo E. *et al.*, 2012).

2.5.1 Necrosis Hepatosit pada Malaria

Studi histologi nekrosis hepar merupakan indikator yang kuat untuk mengungkapkan kerusakan hepar akibat parasit malaria dan efek obat dalam mengurangi kerusakan tersebut (Soniran, 2011) Nekrosis adalah kematian sel atau jaringan pada organisme hidup. Inti sel yang mati dapat terlihat lebih kecil, kromatin dan serabut retikuler menjadi berlipat-lipat. Inti menjadi lebih padat (piknotik) yang dapat hancur bersegmen-segmen (karioreksis) dan kemudian sel menjadi lebih eosinofilik (kariolisis). Sel yang mati memperlihatkan peningkatan eosinofil (yaitu, pulasan merah muda dari pewarnaan eosin pada pengecatan H & E). Gambaran tersebut disebabkan oleh meningkatnya pengikatan eosin terhadap protein intrasitoplasmik yang mengalami denaturasi, dan sebagai akibat hilangnya basofil yang normalnya ditanam oleh RNA dalam sitoplasma (Robbins, 2002).

Nekrosis pada sel hepar berhubungan dengan adanya metabolik perusak yang mengakibatkan deplesi ATP. Pada stadium awal dari fase ekso-eritrositik di hepar, parasit dalam bentuk sporozoit menginfeksi dan bermigrasi di hepar. Migrasi sporozoit tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel hepar, yang dapat ditunjukkan pada meningkatnya serum ALT.

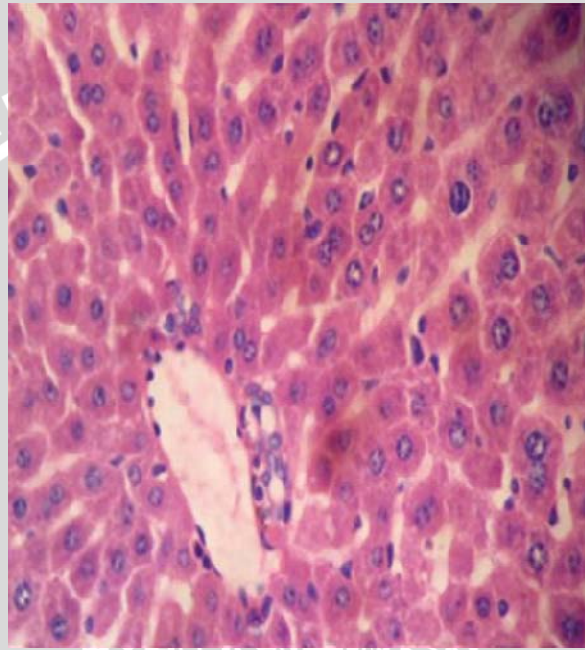
Sebagai usaha untuk menjaga imunologi, hepar meresponi antigen yang dikenali oleh makrofag yaitu sel dendritik, sel kupfer, dan sel endotelial yang merupakan APC mature. Aktivasi sel-sel tersebut mampu membersihkan bakteri

dan endotoksin dari darah. Sebagai konsekuensinya makrofag akan meresponi dengan mensekresi sitokin dan kemokin. Sel kupfer akan memproduksi sitokin dan kemokin seperti TNF- α , IL-1, IL-6 and MCP-1 (terutama TNF- α dan IL-6). Makrofag yang teraktivasi dalam system imun seluler akan menghasilkan radikal bebas, salah satunya ROS. Adanya efek potensiasi antara ROS dengan TNF dan IL-6 inilah yang mendasari terjadinya kelainan patologis. Selanjutnya ROS yang dihasilkan tersebut akan dikeluarkan ke sirkulasi dan menimbulkan kerusakan organ. Dikatakan pula bahwa pada malaria, ROS mempunyai 2 fungsi yang berlawanan, ROS dibutuhkan oleh tubuh untuk eliminasi Plasmodium, tetapi ROS ini juga dapat merusak sel-sel disekitarnya melalui kemampuannya untuk mendegradasi membran lipid dan atau protein. Hal ini akan menyebabkan iskemia/reperfusi yang dapat menyebabkan deplesi ATP dan selanjutnya menyebabkan nekrosis hepatosit (Klotz Christian and Frevert Ute. 2008; Hunt *et al.*,1992; Fitri *et al.*, 1998; Iyawe and Onigbinde, 2011)

Pada infeksi malaria, sel-sel fagosit (makrofag) yang teraktivasi yang mungkin berlokasi di mikrosirkulasi dari limpa, melepaskan sejumlah factor yang terlarut yang berhubungan dengan respon antimalaria hospes, terutama *oxygen derived free radicals (ODFR)* dan sejumlah sitokin. ODFR ini akan memperkuat pelepasan beberapa sitokin, seperti TNF, sedangkan TNF itu sendiri memperkuat produksi ROS dari fagosit (Hunt *et al.*, 1992).

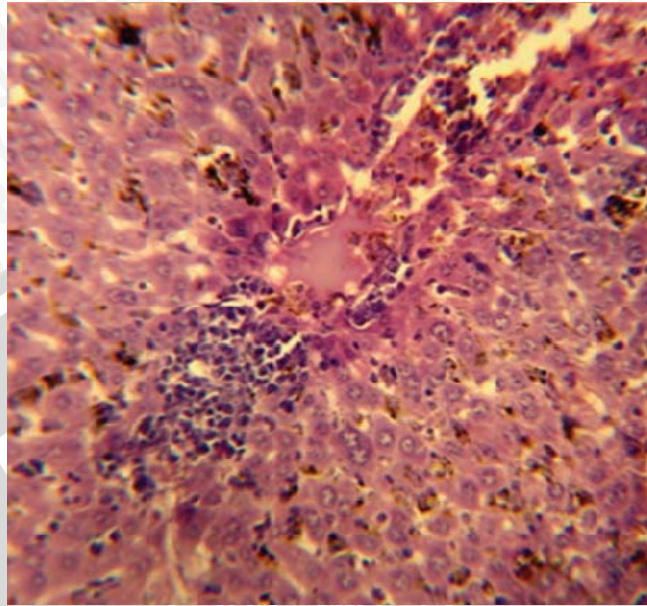
Pada fase eritrositik nekrosis sel hepar juga dapat terjadi akibat sekuestrasi yang berada pada vena porta dan arteri hepatica. Akibat sekuestrasi tersebut akan terjadi peningkatan Fe²⁺ yang dilepaskan eritrosit. Kondisi sekuestrasi tersebut juga disebabkan oleh keadaan *cytoadherence* seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Tingginya kejadian lisis eritrosit terinfeksi juga

berkorelasi dengan tingginya Fe^{2+} yang dilepaskan erosit. Dampak dari peningkatan kadar Fe^{2+} adalah tingginya jumlah radikal bebas (ROI dan RNI) yang berperan penting dalam menginduksi terjadinya kerusakan sel-sel hepar yang dapat menyebabkan nekrosis hepatosit (Taylor R.A.W,2000).



Gambar 2.4 Hepatosit normal yang tidak terinfeksi (Soniran,2012)

Pada gambar 2.3 tampak adanya hepar yang sehat ditandai dengan kondisi hepatosit yang normal. Panah yang terdapat pada gambar 2.3 menunjukkan sel hepar dengan nukleus dan membran yang utuh.



Gambar 2.4 Nekrosis hepatosit pada malaria tanpa pengobatan (Soniran, 2012)

Tampak sebagian sel hati yang menyusun lobulus hati menjadi rusak. Kerusakan ini terlihat pada setiap lobulus. Sel yang rusak mempunyai sitoplasma yang bervakuola dan sebagian tampak pecah. Inti piknosis dan mitosis. Sebagian sel hati mengalami degenerasi hidrofik dan perlemakan hati.

2.6 Terapi dan Resistensi Obat anti malaria

2.6.1 Terapi anti malaria

Semua individu di daerah endemik malaria baik dengan ditemukannya plasmodium aseksual dalam darahnya, ataupun malaria klinis tanpa ditemukan parasit dalam darahnya perlu diobati. Prinsip pengobatan malaria: 1. Penderita tergolong malaria biasa (tanpa komplikasi) atau penderita malaria berat/ dengan komplikasi. Penderita malaria berat/ dengan komplikasi memakai obat parenteral, malaria biasa diobati secara per oral, 2. Penderita malaria harus mendapatkan pengobatan yang efektif, tidak terjadi kegagalan pengobatan dan mencegah terjadinya transmisi yaitu dengan pengobatan ACT (*Artemisin base Combination Therapy*), 3. Pemberian pengobatan dengan ACT harus berdasarkan hasil pemeriksaan malaria yang positif dan dilakukan

monitoring efek/respon pengobatan, 4. Pengobatan malaria klinis/ tanpa hasil pemeriksaan malaria memakai obat non-ACT (PAPDI,2009).

World Health Organization telah menetapkan penggunaan obat ACT. Golongan artemisin (ART) telah dipilih sebagai obat utama karena efektif dalam mengatasi plasmodium yang resisten dengan pengobatan. Selain itu artemisin juga bekerja membunuh plasmodium dalam semua stadium termasuk gametosit. Dan juga efektif terhadap semua spesies, *P. Falciparum*, *P. Vivax* maupun lainnya (Kasper *et al.*, 2005).

Artemisin adalah senyawa aktif yang terdapat di dalam *Artemisia annua* (qing hao). penggunaan obat ini sebagai antimalaria pertama kali dituliskan di dalam *Compendium of Materia Medica* tahun 1596. Namun isolasi senyawa aktifnya yaitu artemisin baru dilakukan pada tahun 1972. Artemisin adalah senyawa seskuiterpen laktone, bukan suatu alkaloid atau amina seperti pada kuinin. Struktur molekulnya mengandung jembatan peroksida yang dapat diputus oleh ion ferro yang berasal dari hemoglobin menjadi radikal bebas yang sangat reaktif sehingga dapat mematikan parasit. Obat ini bekerja dengan cara mengganggu pencernaan hemoglobin di dalam lisosom vakuola makanan. Target baru obat ini adalah menghambat enzim plasmepsin dan enzim falcipain yang berperan dalam pemecahan globin menjadi asam amino. Hemozoin dan asam amino diperlukan untuk pertumbuhan parasit sehingga jika pembentukannya dihambat parasit akan mati. Obat ini sangat efektif untuk pengobatan malaria. (Syamsudin, 2005)

Artemisin memiliki kemampuan untuk melewati membrane eritrosit secara mudah. Artemisin juga berfungsi untuk melawan sel darah merah yang telah terinfeksi parasit. Artemisin mengikat hemoglobin (yang terdapat dalam sel

darah merah) atau hemozoin (yang terdapat dalam parasit malaria. Artemisin juga meningkatkan radikal bebas sehingga terjadi kerusakan pada membrane parasit yaitu mitokondria, retikulum endoplasma kasar, dan membran plasma. Artemisin merupakan obat anti malaria yang lebih efektif terhadap resisten dibandingkan dengan klorokuin dan mefloquine. Artemisin menurunkan jumlah parasit lebih cepat dibandingkan obat anti malaria yang lain. Artemisin juga bisa menurunkan gametosit yang ada dalam tubuh manusia yang terkena malaria. Selain itu artemisin juga memiliki keuntungan lainnya yaitu cepat memulihkan kondisi pasien kembali ke normal dan efek samping dari penggunaan artemisin lebih kecil dibanding obat anti malaria yang lain. Artemisin juga sukses dalam pengobatan di malaria serebral dan pada wanita hamil. (Gordi Toufigh, 2001)

Namun, penggunaan golongan artesunat (golongan artemisin) secara monoterapi akan mengakibatkan terjadinya hemosiderosis sehingga meningkatkan Fe^{2+} dan mengakibatkan nekrosis sel-sel hepar (Olurishe T.O et.al., 2011). Penggunaan golongan artemisinin secara monoterapi juga akan mengakibatkan rekrudensi, karenanya WHO memberikan petunjuk penggunaan artemisinin dengan mengkombinasikan dengan obat antimalaria lain, sehingga disebut Artemisinin base Combination Therapy. Kombinasi ini dapat berupa kombinasi dosis tetap (fixed dose) atau kombinasi tidak tetap (non fixed dose). Kombinasi dosis tetap lebih memudahkan pemberian pengobatan. Contohnya adalah Co-Artem merupakan kombinasi artemeter 20 mg + lumefantrine 120mg. Dosis Co-artem 4 tablet 2x1 sehari selama 3 hari. Kombinasi tetap yang lain adalah Artekin yang berisi dihidroartemisin 40mg + piperakuin 320mg. Dosis artekin untuk dewasa, dosis awal 2 tablet, 8 jam kemudian 2 tablet, 24 jam dan 32 jam, masing-masing 2 tablet.

Kombinasi ACT yang tidak tetap misalnya :

- Artesunat + meflokuin
- Artesunat + amodiakuin
- Artesunat + klorokuin
- Artesunat + sulfadoksin-pirimetamin
- Artesunat + pironaridin
- Artesunat + chloeproguanil-dapson (CDA/Lapdap plus)
- Dihidroartemisinin+piperakuin+trimethoprim (Artecom)
- Artecom+ primakuin (CV8)
- Dihidroartemisinin+naptokuin

Dari obat kombinasi diatas yang tersedia di Indonesia saat ini adalah kombinasi artesunat + amodiakuin dengan nama dagang Artesdiaquine atau Artesumoon. Dosis untuk orang dewasa yaitu artesunat (50mg/tablet) 200mg pada hari I-III (4tablet). Untuk amodiakuin (200mg/tablet) yaitu 3 tablet hari I dan II dan 1 ½ tablet hari III. Artesumoon ialah kombinasi yang dikemas sebagai blister dengan aturan pakai tiap blister/hari (artesunat+amodiakuin) diminum selama 3 hari. Dosis amodiakuin adalah 25-30mg/kgBB selama 3 hari. Penggunaan obat golongan Artemisinin harus dibuktikan dengan pemeriksaan parasit yang positif, setidaknya dengan tes cepat antigen yang positif.

2.6.2 Resistensi Obat Anti Malaria

Resistensi obat malaria adalah kemampuan parasit untuk dapat hidup dalam tubuh manusia, berkembangbiak dan menimbulkan gejala penyakit meskipun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standar maupun dosis yang lebih tinggi yang bias ditolerir oleh pemakai obat (Lobel

HO,1986). Ini berarti resistensi terhadap schizontisidal, gametosidal, dan sporontosidal. Secara umum, resistensi terjadi melalui mutasi spontan yang mengurangi sensitivitas terhadap obat atau golongan obat yang diberikan. Pada beberapa obat hanya terjadi mutasi titik tunggal sedangkan obat lain nampaknya memerlukan beberapa mutasi (Thaitong S, 1983). Telah dilaporkan beberapa kasus mengenai resistensi terhadap obat malaria yaitu terhadap 4 Aminokuinolin (Klorokuin dan Amodiakuin diberbagai wilayah dunia. Malaria falciparum yang resisten terhadap Klorokuin in vitro dan in vivo pernah dilaporkan di 27 propinsi Indonesia dengan berbagai derajat resistensi. Resistensi terhadap Sufadoksin-Pirimetamin di 11 propinsi (Irian Jaya, Lampung, Jawa Tengah, Sumatera Utara, Aceh, Riau, Sulawesi Selatan, DKI Jakarta, Kalimantan Timur, dan Sulawesi utara). Resisten terhadap Kina di 5 propinsi (Jawa Barat, Jawa Tengah, NTT, Irian Jaya, Kalimantan Timur), sedangkan terhadap Meflokuin di 3 propinsi (Jawa Tengah, Irian Jaya, dan Kalimantan Timur) (PAPDI,2009).

Pencegahan resistensi dapat dilakukan dengan kombinasi obat antimalaria. Tujuan kombinasi ini adalah untuk meningkatkan efikasi antimalaria maupun aktivitas sinergistik antimalaria dan memperlambat progresifitas resistensi parasit terhadap obat antimalaria yang baru. Proses pengobatan kombinasi dapat digunakan lebih dari satu obat antimalaria yang bersifat skizontisidal darah (WHO,2010).

2.7 Kelor (*Moringa oleifera*)

Moringa oleifera atau yang biasa kita kenal dengan daun kelor, dapat ditemukan di berbagai belahan dunia. Tanaman ini memiliki profil taksonomi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super division	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Eudicots
Subclass	: Rosidsae
Order	: Brassicales
Family	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Species	: <i>Moringa oleifera</i> (Sachan <i>et al.</i> , 2011).

Tanaman kelor (*Moringa oleifera*) adalah tanaman yang mampu tumbuh dengan cepat. Kelor berupa pohon yang selalu ada sepanjang tahun dan dapat mencapai tinggi maksimum 7-12 meter dan berdiameter 20-40 sentimeter pada daerah setinggi dada. dapat tumbuh di dataran rendah maupun di dataran tinggi sampai ketinggian sekitar 1.000 meter di atas permukaan laut (dpl). (Putri,2011)

Moringa oleifera didapatkan dari nama Indian Selatan (Tamil) merupakan genus pada keluarga Moringaceae dengan adanya 12 spesies pohon dari Afrika Utara hingga Asia Selatan. Selain itu *Moringa Oleifera* merupakan spesies diploid dengan 28 kromosom, beberapa spesies dari *Moringa* telah dibuktikan berguna sebagai sumber makanan, serat, pengobatan, dan produk yang lain.

Dua sampai tiga kali daun muda pada tangkai tumbuh di ujung cabang secara bergantian. Panjangnya sekitar 20-70 cm, berwarna keabu-abuan dan berbulu halus saat muda, bertangkai daun panjang dengan 8-10 pasang pinnae. Bunga kelor berbau harum dan manis, memiliki lebar 2,5 cm dan dihasilkan di ketiak daun dengan panjang 10-25 cm. mahkotanya berwarna putih atau krem

dan pada bagian dasar terdapat bintik-bintik kuning. Buah kelor berbentuk 3 cuping polong dengan panjang 20-60 cm. tiap polong berisi 12-35 biji (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991; Foidl *et al.*, 2001)

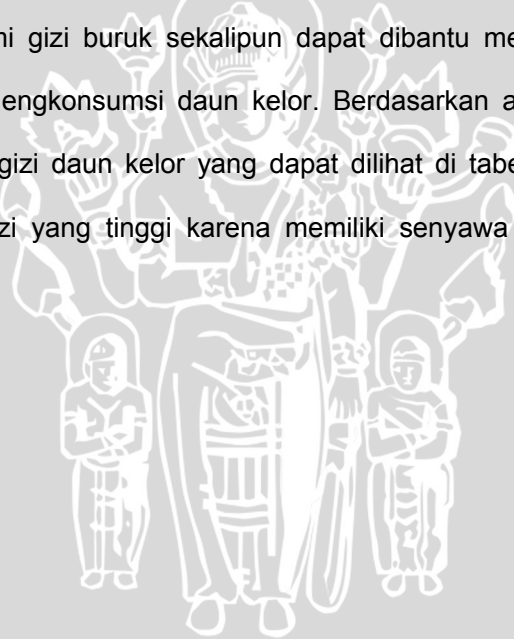
Kelor adalah tanaman yang memiliki banyak fungsi, tidak hanya dibidang pangan karena mengandung banyak kandungan gizi dan kesehatan, namun tanaman ini juga dapat dipakai sebagai penjernih air (Foidl *et al.*, 2001)

2.7.1 Nutrisi Kelor

Moringa oleifera kaya akan vitamin A, vitamin B1 (thiamin), vitamin C, vitamin E, arginin, beta-sitosterol, *caffeoylquinic acid*, kalsium, tembaga, sistin, omega 3, omega 6, omega 9, *glutathion*, histidin, *Indole Acetic Acid*, *Indoleacetonitrile*, Isoleusin, Kaempferol, Leusin, Magnesium, *Oleic-Acid*, *Phenylalanine*, Potasium, *Quercetin*, Rutin, Selenium, Stigmasterol, Sulfur, Triptofan, Tirosin, Zeatin, dan seng. Asam askorbat/vitamin C ada dalam Moringa Oleifera mulai dari 92 sampai 126 mg per 100 g dari buahnya. Buah, bunga, dan daun yang masih muda terdiri dari 5-10% dari protein. Biji yang imatur setelah dibakar bisa dikonsumsi atau dimasak terlebih dahulu. Akar dari Moringa kaya akan alkaloid dan bisa juga menjadi senyawa toksik. Biji dari Moringa terdiri dari 19-47% dari minyak, yang banyak digunakan untuk dikonsumsi, kosmetik, dan sabun serta minyak wangi. Selain itu biji yang telah dikeringkan juga efektif sebagai coagulant yang murah untuk memindahkan turbiditas dan mengurangi kombinasi dari bakteri dan virus saat meminum air di Sudan, Malawi, India, Myanmar, dan Indonesia. Dalam bidang medis, Moringa berguna untuk rematik, asites, gigitan beracun, dan stimulant untuk kardiovaskular (Roloff, 2009).

Ekstrak metanol dari *Moringa oleifera* diketahui dapat menurunkan jumlah parasitemia dalam darah karena memiliki kemampuan untuk meningkatkan jumlah sel darah putih darah (Ochechukwu, *et al.*, 2013). Ekstrak etanol *Moringa oleifera* juga memiliki aktivitas antiinflamasi karena kandungan petroleum ether dan ethanol (Luqman S. *et al.*, 2012). Kedua bahan aktif tersebut juga diketahui memiliki aktivitas antimalaria, suatu kemampuan yang sama yang dimiliki oleh *Artemisia sp* (Ferreira J.F.S. *et al.*, 2010).

Lowell J. Fuglie, seorang warga Negara Prancis adalah orang yang pertama kali meneliti kandungan nutrisi daun kelor dan membuktikan bahwa ibu hamil yang mengalami gizi buruk sekalipun dapat dibantu memiliki bayi yang sehat dengan cara mengkonsumsi daun kelor. Berdasarkan analisisnya dapat diketahui kandungan gizi daun kelor yang dapat dilihat di tabel 2.1 Tanaman kelor mengandung gizi yang tinggi karena memiliki senyawa isotiosianat dan glukosinolat.



Tabel 2.1 Analisis kandungan gizi daun kelor berdasarkan Fuglie (2001)

Komponen	Biji	Daun	Tepung daun
Kadar Air (%)	86.9	75.0	7.5
Kalori	26	92	205
Protein (g)	2.5	6.7	27.1
Lemak (g)	0.1	1.7	2.3
Karbohidrat (g)	3.7	13.4	38.2
Fiber (g)	4.8	0.9	19.2
Mineral (g)	2.0	2.3	-
Ca (mg)	30	440	2.003
Mg (mg)	24	24	368
P (mg)	110	70	204
K (mg)	259	259	1.324
Cu (mg)	3.1	1.1	0.57
Fe (mg)	5.3	7	28.2
S (mg)	137	137	870
<i>Oxalit acid</i> (mg)	10	101	1.6%
Vitamin A-B <i>carotene</i> (mg)	0.11	6.8	16.3
Vitamin B - <i>choline</i> (mg)	423	423	-
Vitamin B1 - <i>thiamin</i> (mg)	0.05	0.21	2.64
Vitamin B2 - <i>riboflavin</i> (mg)	0.07	0.05	20.5
Vitamin B3 - <i>nicotinic acid</i> (mg)	0.2	0.8	8.2
Vitamin C - <i>ascorbic acid</i> (mg)	120	220	17.3
Vitamin E - <i>tocopherol</i> (mg)	-	-	113
<i>Arginine</i> (g/16gN)	3.6	6.0	1.33%
<i>Histidine</i> (g/16gN)	1.1	2.1	0.61%
<i>Lysine</i> (g/16gN)	1.5	4.3	1.32%
<i>Tryptophan</i> (g/16gN)	0.8	1.9	0.43%
<i>Phenylalanine</i> (g/16gN)	4.3	6.4	1.39%
<i>Methionine</i> (g/16gN)	1.4	2.0	0.35%
<i>Threonine</i> (g/16gN)	3.9	4.9	1.19%
<i>Leucine</i> (g/16gN)	6.5	9.3	1.95%
<i>Isoleucine</i> (g/16gN)	4.4	6.3	0.83%
<i>Valine</i> (g/16gN)	5.4	7.1	1.06%

Berdasarkan berat keringnya daun kelor mengandung protein sekitar 27% dan kaya akan vitamin A, vitamin C, kalsium, besi dan fosfor. daun kelor juga mengandung alkaloid, moringinan, pterigospermin. Screening fitokimia pada ekstrak kelor didapatkan fenolik, flavonoid, tannin, glikosida. Sejumlah hasil penelitian menunjukkan bahwa daun kelor segar mempunyai kandungan asam amino yang lengkap, vitamin yang lengkap dan kandungan mineral yang tinggi. Setiap 100 g daun kelor mengandung 3390 SI vitamin A. Dua kali lebih tinggi dari bayam dan 30 kali lebih tinggi dari buncis juga 4 kali lebih besar dari wortel. Setiap 220 mg daun kelor segar setara dengan 7 kali vitamin C buah jeruk, yang berperan dalam metabolisme besi dan peningkatan hemoglobin tubuh dalam keadaan anemia (Nambiar *et al.*, 2010). Pada daun kelor dikeringkan dan ditumbuk maka nutrisinya dapat meningkat berkali-kali lipat kecuali vitamin C-nya (Putri, 2011; Koruthu *et al.*, 2011). *Moringa Oleifera* telah dibuktikan mempunyai efek antioksidan dan antiinflamasi secara invitro, terutama dihasilkan oleh kandungan senyawa fenolnya, yaitu *quercetin*. Kandungan total fenol dalam ekstrak *Moringa oleifera* adalah 118 mg/g, merupakan kadar yang cukup tinggi bila dibandingkan dengan tanaman lain yang juga mengandung fenol (Chumark, 2005)

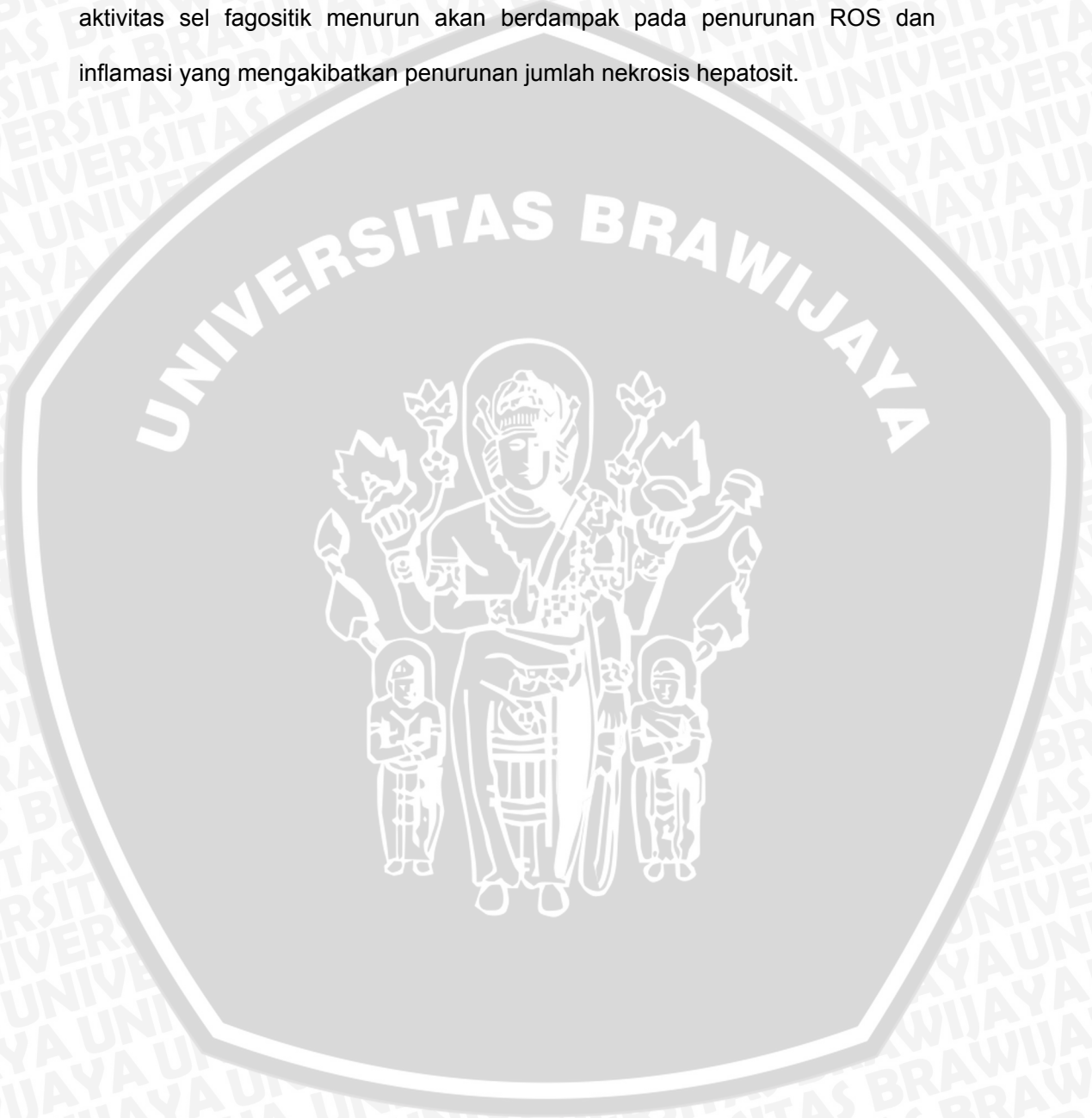
2.7.2 Hubungan Kelor dengan Nekrosis Hepatosit

Daun kelor memiliki kandungan vitamin C tujuh kali lipat kandungan vitamin C jeruk (Gladstone, 2009). Vitamin C merupakan antioksidan, mampu melindungi berbagai biomolekul melawan kerusakan yang diakibatkan ROS dan RNS. Berbagai fungsinya antara lain: mengikat O_2^- dan HO_2 , mengikat OH,

mengikat radikal peroksil yang larut air (RO_2), menghambat *lipid peroxidation* yang diinduksi hemoglobin atau myoglobin H_2O_2 (Halliwell and Gutteridge, 1999). Vitamin C telah dilaporkan bermanfaat untuk pembentukan tulang, metabolisme asam folat, pembentukan dan maturasi eritrosit dan mekanisme respon imun. Antioksidan memberikan perlindungan terhadap stress oksidatif pada infeksi malaria dan vitamin C juga berperan penting dalam menunjang penatalaksanaan infeksi malaria (Iyawe and Onigbinde, 2011). Frei *et al.*, 1990 menyatakan vitamin C adalah vitamin larut air yang dapat bereaksi dengan radikal bebas dan efektif melindungi sel dari lipid peroksidase, selain itu pernah dilaporkan adanya efek yang baik jika dilakukan terapi kombinasi antara kloroquin dan vitamin c pada infeksi malaria (Iyawe *et al.*, 2006). Pada keadaan prooksidan meningkat dan antioksidan menurun maka akan menyebabkan kerusakan molekuler dan jaringan. Stres oksidatif adalah akibat yang disebabkan oleh ketidakseimbangan itu. Pada infeksi malaria memicu pembentukan radikal bebas di hati sebagai respon tubuh yang dapat menginduksi stress oksidatif dan nekrosis (Sohail *et al*, 2007).

Moringa oleifera juga mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang penting yang terdapat dalam Moringa oleifera. Flavonoid berperan penting sebagai antioxidant, antiinflamasi, antitumor, antiviral, dan imunomodulator (Oliveira, *et al.*, 2002). Flavonoid adalah antioksidant yang kuat dalam menetralsir radikal bebas dan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Jenis flavonoid yang terdapat dalam Moringa oleifera adalah quercetin dan kaemperferol. Quercetin dan kaemperferol yang terdapat pada Moringa oleifera bisa menghambat proliferasi pada sel fagositik (Hanausek Margaret, 2011) Selain itu ternyata quercetin dan kaemperferol bisa

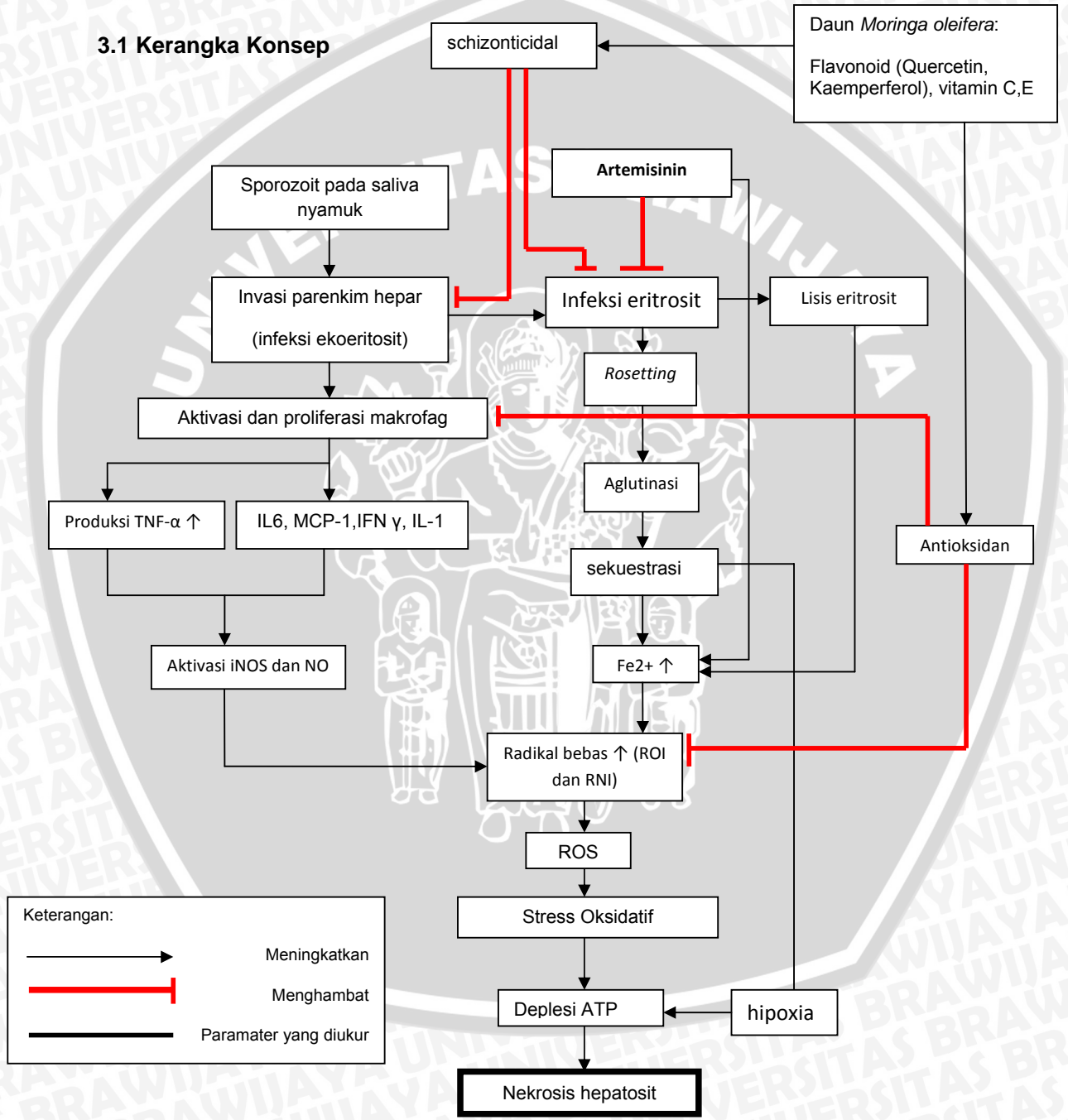
menghambat radikal O₂ yang dihasilkan oleh sel kupffer serta menghambat sintesis NO dan INOs atau ROS (Vrba and Modriansky, 2002). Sehingga ketika aktivitas sel fagositik menurun akan berdampak pada penurunan ROS dan inflamasi yang mengakibatkan penurunan jumlah nekrosis hepatosit.



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep:

Infeksi malaria pada manusia berawal pada saat nyamuk *Anopheles betina* menginokulasi sporozoit *Plasmodium falciparum* saat menggigit manusia. Sporozoit ini akan masuk ke dalam aliran darah maupun saluran limfatik terdekat menuju ke hepar. Fase ini adalah fase eksoeritrosit dimana pergerakan parasit di parenkim hepar akan mengaktifkan sistem imun dan makrofag di hepar. Aktivasi dari makrofag/sel kupffer pada hepar menghasilkan sitokin-sitokin proinflamasi yaitu IL6, MCP-1, IFN γ , IL-1 dan TNF- α . Sebagai respons terhadap sitokin proinflamasi di atas, maka sel kupffer yang telah teraktivasi akan mengekspresikan nitric oxide synthase type II (iNOS) dan memproduksi nitric oxide (NO) yang akan meningkatkan reactive oxygen species (ROS).

Setelah berada pada hepar, sporozoit akan bermultiplikasi menjadi merozoit yang akan menginvasi sel darah merah (fase eritrositik) yang selanjutnya akan berubah menjadi schizont. Eritrosit yang terinfeksi akan mengalami proses *rosetting* (perlekatan dengan eritrosit lain yang terinfeksi atau dengan eritrosit lain yang tidak terinfeksi), aglutinasi, dan sekuestrasi. Akibat sekuestrasi tersebut akan terjadi peningkatan Fe^{2+} yang dilepaskan eritrosit. Adanya sekuestrasi juga akan menyebabkan hipoxia pada jaringan hepar yang akan menyebabkan peningkatan ROS. Tingginya kejadian lisis eritrosit terinfeksi juga berkorelasi dengan tingginya Fe^{2+} yang dilepaskan eritrosit. Dampak dari peningkatan kadar Fe^{2+} adalah tingginya jumlah radikal bebas (ROI dan RNI). Peningkatan ROS tersebut akan mengakibatkan adanya kerusakan oksidatif. Akibat adanya kerusakan oksidatif maka akan terjadi stress oksidatif yang menyebabkan deplesi ATP dan terjadilah nekrosis hepatosit.

Artemisin bekerja dengan membentuk radikal bebas yang akan menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam parasit yang mampu mengeliminasi parasit sehingga mampu mencegah terjadinya keadaan parasitemia. Penggunaan artemisin secara monoterapi akan mengakibatkan terjadinya hemosiderosis sehingga meningkatkan Fe^{2+} dan mengakibatkan nekrosis sel-sel hepar.

Penggunaan ekstrak daun kelor yang memiliki sifat antioksidan (kandungan flavonoid, vitamin C dan E) diharapkan mampu membantu kerja artemisin dalam mengeliminasi parasit malaria. Kandungan antioksidan tersebut dapat menghambat proliferasi sel kupfer hepar dan menghambat terbentuknya Radikal bebas. Selain itu *moringa oleifera*

juga memiliki efek schizonticidal yang dapat mengeliminasi parasit dalam eritrosit maupun eksoeritrosit sehingga efek pemberian kombinasi artemisin dan ekstrak daun kelor menjadi lebih baik daripada pemberian monoterapi Artemisin.

3.3 Hipotesis Penelitian :

1. Kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan Artemisin dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium Berghei*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) di mana subyek dibagi menjadi 6 kelompok (I sampai dengan VI) secara acak. Tiap kelompok terdiri dari 5 mencit. Kelompok I adalah mencit yang tidak diinfeksi *P. berghei* (kontrol negatif), kelompok II mencit diinfeksi *P. berghei* (kontrol positif), kelompok III mencit diinfeksi *P. berghei* dan diberi perlakuan dengan Artemisin, sedangkan kelompok IV sampai dengan VI (3 kelompok) mencit diinfeksi *P. berghei* dengan ekstrak metanol daun kelor dan Artemisin dalam berbagai dosis.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April sampai dengan Juni 2012.

4.3 Binatang Coba

4.3.1 Binatang Coba, Obyek, dan Teknik Randomisasi

Parasit yang digunakan adalah *Plasmodium berghei* galur Anka (PbA) yaitu salah satu model malaria pada mencit (Janse and Waters,2002). Parasit diambil dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Binatang coba yang dipakai adalah mencit berjenis kelamin jantan galur BALB/c sesuai dengan

kriteria inklusi. Hewan coba diperoleh dari Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada, Yogyakarta dan dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan di dalam kandang yang dijaga kebersihannya.

Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode rancangan acak lengkap atau *randomized completely design* mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan ini memungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol.

4.3.2 Kriteria Inklusi

1. Mencit galur BALB/c
2. Mmur 6-8 minggu
3. Berat badan \pm 20-40 gram
4. Jenis kelamin jantan
5. Dalam keadaan sehat selama penelitian

4.3.3 Kriteria Eksklusi

Mencit yang selama penelitian tidak mau makan, tikus yang kondisinya menurun, sakit dalam masa persiapan atau adaptasi.

4.3.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat 6 perlakuan, maka jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicapai dengan rumus $[(np-1)-(p-1)]$

≥ 16 dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan. Dari sejumlah sampel ini akan diuji dengan level signifikansi 95%. (Indra,1999)

$$[(np-1)-(p-1)] \geq 16$$

$$[(6n-1)-(6-1)] \geq 16$$

$$(6n-1)-5 \geq 16$$

$$(6n-1) \geq 21$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3.5$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 6 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan adalah 4. Sedangkan satu ekor sisanya untuk cadangan. Jadi untuk 6 kelompok dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah infeksi *P. berghei* dan pemberian ekstrak daun kelor secara per oral dan Artemisin dengan berbagai dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah indeks nekrosis hepatosit.

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi : jenis mencit, umur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan awal, kondisi lingkungan kandang, pemberian per oral Artemisin dengan sonde, pemberian per oral ekstrak metanol daun kelor dengan sonde.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Inokulasi *Plasmodium berghei*

Bahan : *Plasmodium berghei* dari darah mencit yang terinfeksi yang berasal dari Laboratorium Parasitologi Brawijaya, larutan PBS, larutan M+, EDTA, methanol PA, larutan Giemsa, buffer Giemsa, kapas alkohol.

Alat : tabung *efendorf*, tabung *falcon* 15 ml, Mikropipet, Pinset, gunting steril, mikroskop, hemositometer, spuit insulin 1 ml, *object glass*, tabung gelas ukur, pipet kaca.

4.5.2. Pemberian Artemisin dan ekstrak daun kelor

Bahan : Aquadest, Artemisin pro analisa (sigma) dan ekstrak daun kelor pro analisa (sigma)

Alat : Gelas ukur, timbangan untuk obat

4.5.3. Pengukuran Parasitemia

Bahan : gelas benda, gunting, pipet, tabung gelas ukur, kapas alkohol, methanol PA, pulas giemsa, buffer giemsa, minyak imersi

Alat : mikroskop

4.5.4. Pengukuran Nekrosis Hepatosit

Alat dan bahan : Liquid blocker (PapPen), 4% paraformaldehide yang larut pada PBS (pH 7.2), solusi hematoxylin Mayer, Metallic salt aluminium sulfate, asam asetat, 70% EtOH, 90% EtOH, 100% EtOH, Depex dan xylene.

4.6 Definisi Operasional

1. Pemberian per oral (sonde) ekstrak metanol daun kelor

Sediaan daun kelor berasal dari Madura, Jawa Timur dan diekstrak di laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya. Perlakuan adalah pemberian suplementasi ekstrak metanol daun kelor 0,125 mg/g, 0,25 mg/g, dan 0.5mg/g per hari dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde (Sudha,2010).

2. Pemberian per oral (sonde) Artemisin

Artemisin yang digunakan diperoleh dari PT.Trimitra Sehati, Indonesia. Perlakuan adalah pemberian artemisin dengan dosis 0.04 mg/g (Kasper *et al.*,2005).

3. Mencit galur Balb/c

Mencit yang digunakan dari galur Balb/c dengan jenis kelamin jantan, umur 6-8 minggu, dan berat badan \pm 20-40 gram.

4. Mencit model malaria

Mencit diinokulasi dengan *P. berghei* dilakukan secara intra peritoneal pada semua kelompok mencit dengan dosis memberikan 10^7 parasit dalam 0.2 ml darah. Lalu dilakukan pemeriksaan parasitemia setiap dua hari selama 8-14 hari (Guha,2006).

5. Derajat parasitemia

Derajat parasitemia adalah presentasi eritrosit yang terinfeksi dalam 1000 eritrosit. Dihitung dengan hand counter pada hapusan darah tipis dengan pewarnaan giemsa Parasitemia jika mencapai \pm 10 % (Hilau A, 2005).

6. Nekrosis Hepatosit dalam jaringan hepar (O.T Soniran,2012)

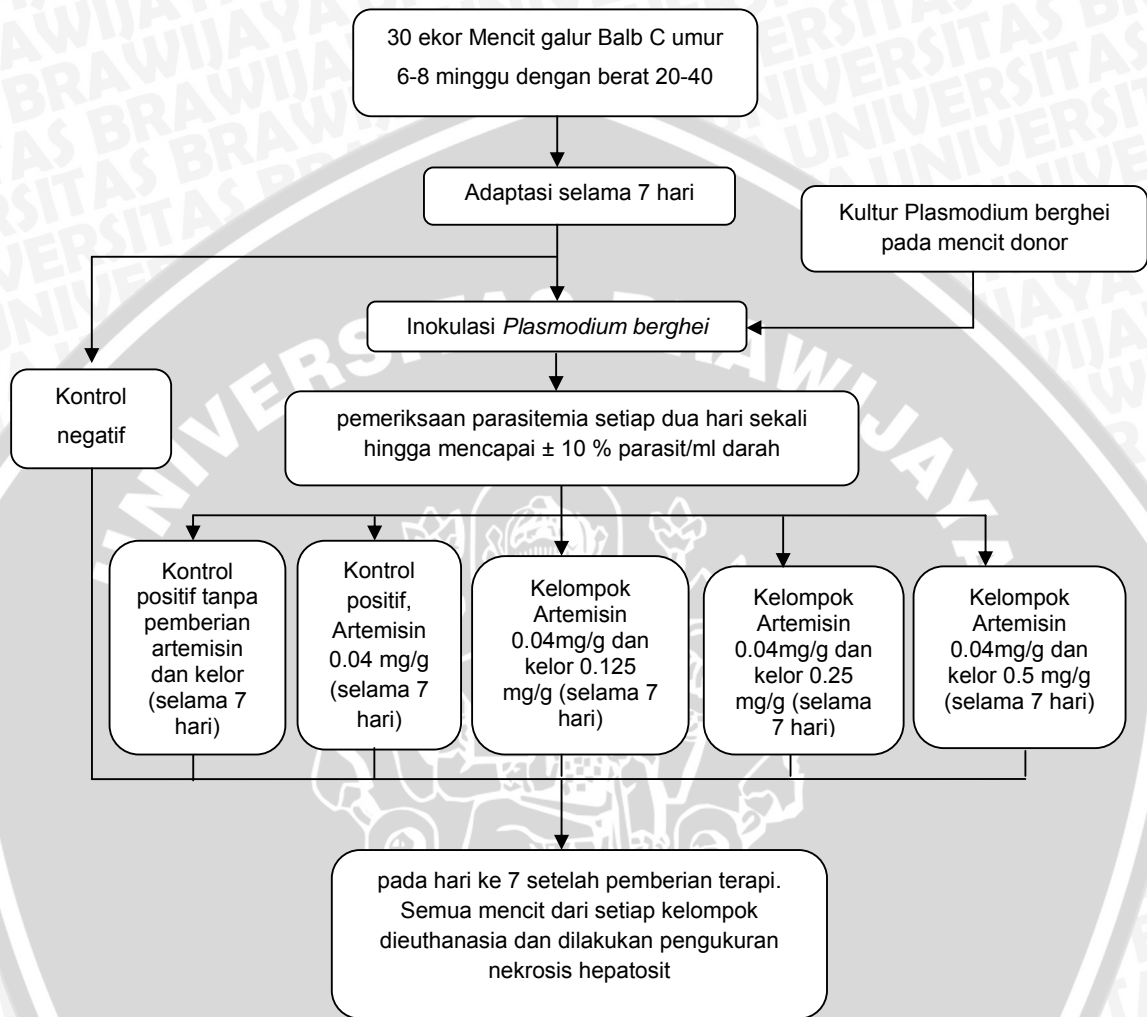
Nekrosis hepatosit diukur dengan menggunakan metode hematoxylin dan eosin. Sel-sel hepar yang nekrosis terlihat intinya kariolisis (bersegmen-segmen), kariokinesis (pecah), dan piknotik (mengekrut) serta anak intinya akan terlihat menonjol.

7. Indeks Nekrosis hepatosit

Merupakan persen dari jumlah nekrosis hepatosit dibagi dengan jumlah sel total (sel sehat dan sel nekrosis) dalam satu lapangan pandang. Kemudian dihitung rerata dari 10 lapangan pandang secara berurutan.

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek kombinasi Artemisin dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan nekrosis hepatosit pada hepar mencit galur Balb/c yang telah diinfeksi dengan P.bergei. Alur penelitian dapat dijelaskan sebagai berikut.



4.7.1 Thawing isolat *Plasmodium berghei* (Blazquez *et al.*, 2008)

Isolat parasit diambil dari *liquid Nitrogen Tank*. Ditambah NaCl 12%. 1/5 volume (3gr) tetes dengan spuit, ditunggu 5 menit. Ditambah NaCl 16% 9x volume (0.4g) tetes demi tetes dengan spuit, tunggu 5 menit. Lalu sentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 200 rpm. Supernatan dibuang, ditambah 0.9% NaCl (0.225g), 0.2% glukosa 9x volume (0.04 g) tetes demi tetes dengan spuit. Ditunggu 5 menit. Sentrifuse kembali selama 5 menit dengan kecepatan 2000

rpm buang supernatant. Tambahkan CM (*complete Media*) 15% 6 ml. Masukkan ke dalam *falsk culture*. Semua pekerjaan yang berhubungan dengan isolat *P. berghei* dilakukan dalam *laminar air flow vertical* dan bersifat aseptik.

4.7.2 Inokulasi *Plasmodium berghei* (Blazquez *et al*,2008)

Inokulasi *Plasmodium berghei* dilakukan secara intraperitoneal (i.p) sebanyak 10^7 parasit dalam 0.2 ml darah untuk setiap mencit. Jumlah eritrosit per ml darah dan parasitemia mencit donor yang akan ditransfer parasitnya terlebih dahulu dihitung. Darah yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diambil sebanyak 10 μ L dan dilakukan pengenceran 10^4 x dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung eri *Naubauer* sehingga diketahui jumlah eritrosit/ml darah dengan rumus ($N \times 5 \times 10^4$ x pengenceran), di mana N adalah jumlah aeritrosit. Selanjutnya jumlah parasit mencit donor dihitung dengan mengkalikan jumlah eritrosit/ml darah dengan prosentase parasitemia. Jumlah parasit yang hendak diberikan sebesar 10^7 dalam 0.2 ml darah sama artinya dengan memberikan 5×10^7 parasit dalam 1 ml darah sehingga pengenceran yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah parasit tersebut adalah: jumlah parasit/ 5x.

4.7.3 Pengukuran Derajat Parasitemia (Sardjono dan Fitri, 2007)

Dengan membuat hapusan darah. Caranya dengan mengambil setetes darah dari ekor mencit dengan menggunting ekor mencit dan ditetaskan pada objek glass. Tetesan darah tersebut ditipiskan dengan menggunakan tepi *object glass* dan ditunggu sampai kering. Kemudian hasil hapusan difiksasi dengan menggunakan methanol , teteskan merata dan ditunggu sampai kering.

Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Giemsa (Giemsa fluka dan buffer Giemsa dengan perbandingan 1:9). Teteskan Pewarna Giemsa pada hapusan darah lalu tunggu selama 20 menit, selanjutnya bilas dengan air mengalir hingga tidak ada lagi zat warna yang tersisa lalu keringkan. Hasil pewarnaan di periksa di bawah mikroskop untuk menilai parasitemianya, menggunakan pembesaran 1000x dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi malaria dari 1000 eritrosit. Parasitemia (%) adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi Plasmodium berghei dalam 1000 eritrosit.

4.7.4 Pengukuran Nekrosis Hepatosit

Metode pengukuran nekrosis hepatosit adalah dengan hematoxylin eosin. Siapkan slide pada ruang temperature dan preparat dalam liquid blocker (PapPen) untuk mencegahnya keluar dari inkubasi. Lalu fiksasi dengan 4% paraformaldehyde yang larut pada PBS (pH 7.2) selama 5 menit. Kemudian cuci slide selama 1 menit dan keringkan. Lakukan pewarnaan hematoxylin dengan menginkubasi slide pada solusi hematoxylin Mayer selama 5 menit untuk mewarnai nucleus yang gelap. Kemudian lakukan pewarnaan biru dengan membersihkan dengan air hangat selama 10 menit. Hematoxylin digunakan bersamaan dengan kombinasi metallic salt aluminium sulfate. Kemudian cuci slide untuk menetralkan asam dan membebaskan group OH yang akan mengubah warna nuclei menjadi biru. Untuk pewarnaan eosin tambahkan asam asetat pada 0.5% solusi eosin dan inkubasikan slide selama 10 menit untuk member warna merah. Lalu cuci slide 3x dalam 1 menit. Keringkan dengan 70% EtOH selama 1 menit, 90% EtOH selama 30 detik, 100% EtOH selama 30 detik,

dan xylene selama 30 detik. Lalu tetesi slide dengan 1-2 tetes Depex dan tutupi dengan slide penutup dan hindari gelembung. (Markus A. Rüegg, 2012)

4.7.5 Penghitungan Indeks Nekrosis Hepatosit

Kelainan patologis pada hepatosit dapat diukur dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Hitung Indeks nekrosis hepatosit per lapangan pandang dengan cara :

$$\frac{\text{Jumlah nekrosis hepatosit}}{\text{Jumlah hepatosit sehat + nekrosis}} \times 100\% = \text{Indeks nekrosis hepatosit}$$

kemudian ambil rerata dari 10 lapangan pandang secara berurutan (Matsumoto *et al*,2005).

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Hasil pengukuran derajat parasitemia dan nekrosis hepatosit pada mencit kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 15 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas data : menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p>0,05$). Karena itu untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis digunakan uji parametrik.
2. Uji homogenitas varian : menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p=0,248$), karena itu analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

3. Uji *One Way ANOVA* : didapatkan nilai rata-rata indeks nekrosis hepatosit dari ketujuh populasi memang berbeda ($p=0,001$). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.
4. *Post Hoc test* (uji Tuckey HSD) : uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p<0,05$).
5. Uji *homogenous subsets* : menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji Tuckey.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data

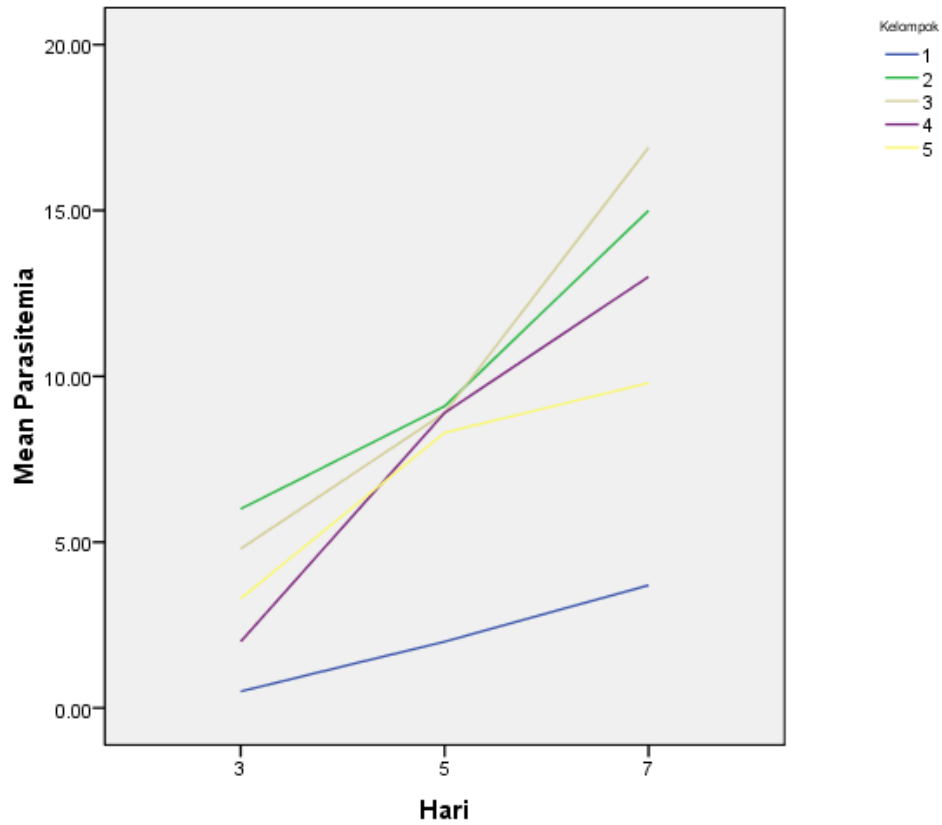
Penelitian ini menggunakan 5 ekor mencit donor yang diinokulasi dengan *Plasmodium berghei* selama 7 hari. Kemudian darah mencit donor disuntikkan pada 25 mencit perlakuan (5 mencit kontrol positif, 5 mencit perlakuan artemisin, 5 mencit perlakuan kombinasi artemisin daun kelor 0,125 mg/gBB, 5 mencit perlakuan kombinasi artemisin dan daun kelor 0,25 mg/gBB, serta 5 mencit perlakuan kombinasi artemisin dan daun kelor 0,5 mg/gBB). Berikut ini adalah data parasitemia mencit donor yang dihitung selama 3 kali dalam waktu 7 hari.

Tabel 5.1 Derajat Parasitemia pada Mencit Donor

Mencit Donor	Hari 3	Hari 5	Hari 7
I	0,5 %	2 %	3,7 %
II	6 %	9,1 %	15 %
III	4,8 %	8,9%	16,9 %
IV	2 %	8,9%	13 %
V	3,3 %	8,3 %	9,8 %

Pada tabel 5.1 didapatkan data bahwa mencit donor II dan III memiliki derajat parasitemia yang paling tinggi dibandingkan kelompok donor mencit yang lain sejak pengukuran derajat parasitemia hari 3. Pada hari ke-6, derajat parasitemia tertinggi didapatkan pada kelompok mencit donor II, III, dan IV.

Sedangkan pada hari ke-7, mencit donor II dan III memiliki derajat parasitemia yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok donor mencit yang lain.



Gambar 5.1 Grafik Perbedaan Rata-Rata Derajat Parasitemia pada Mencit Donor

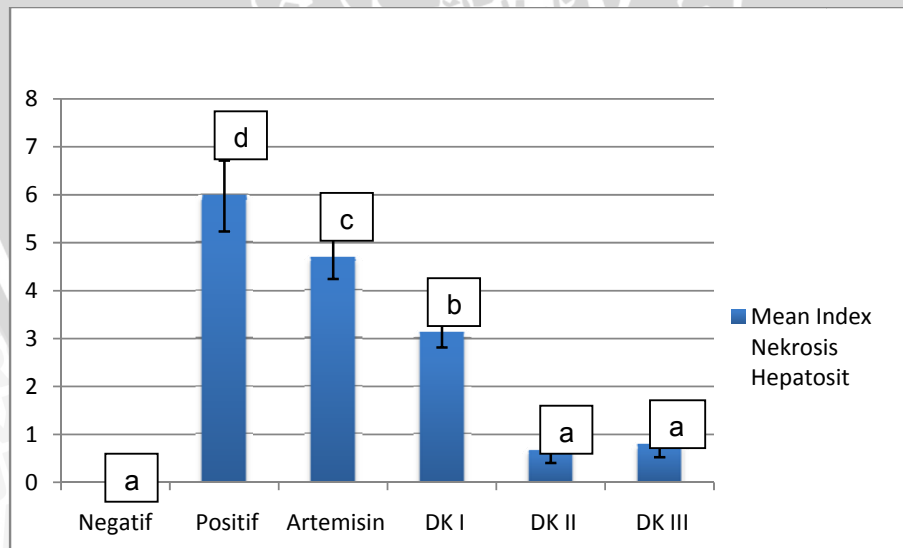
Gambar 5.1 juga menunjukkan perbedaan yang signifikan pada kelompok mencit donor II dan III. Pada kedua kelompok mencit donor tersebut memiliki hasil yang paling signifikan dan derajat parasitemianya mencapai lebih dari 10% pada hari ke-7, sehingga darah kedua mencit donor tersebut yang diinjeksikan pada mencit kontrol positif, kelompok perlakuan artemisin, dan kelompok kombinasi artemisin dengan daun kelor.

Berdasar penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil untuk tiap-tiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini terdiri atas 6 kelompok perlakuan. Kelompok I adalah mencit yang tidak diinfeksi *Plasmodium berghei* yang disebut sebagai kontrol negatif, kelompok II adalah mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* yang disebut sebagai kontrol positif, kelompok III adalah mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi perlakuan dengan Artemisin sebanyak 0,04 mg/gBB, sedangkan kelompok IV sampai dengan VI (3 kelompok) merupakan mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi perlakuan kombinasi ekstrak daun kelor (0,125 , 0,25 , dan 0,5 mg/gBB) dan Artemisin sebanyak 0,04 mg/gBB. Pada setiap kelompok perlakuan dilakukan pengukuran indeks nekrosis hepatosit pada jaringan hepar mencit. Indeks nekrosis sel hepar pada tiap kelompok perlakuan dihitung dengan cara jumlah sel nekrosis dibagi jumlah seluruh sel hepar (nekrosis+normal) tiap lapangan pandang dikali 100% kemudian ambil rata-rata dari 10 lapangan pandang secara berurutan. Penghitungan rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada tiap-tiap kelompok perlakuan ditampilkan pada gambar 5.2.

Tabel 5.2 Rata-Rata dan Standar Deviasi Indeks nekrosis hepatosit pada 6 Kelompok Mencit

Kelompok	Mean	Standar Deviasi
Kontrol Negatif	0,0000	0,00000
Kontrol Positif	5,9740	0,74005

Perlakuan Artemisin	4,6840	0,44145
Perlakuan DK I	3,1240	0,31126
Perlakuan DK II	0,6800	0,27704
Perlakuan DK III	0,7820	0,25869



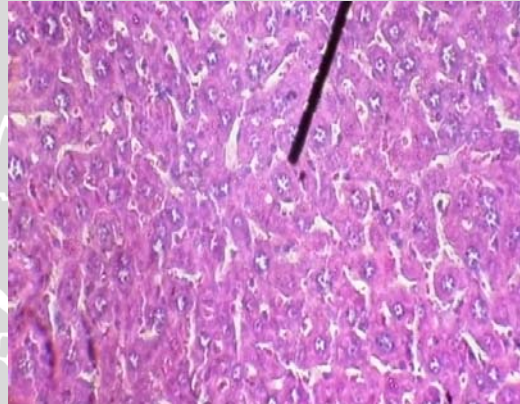
Gambar 5.2 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Indeks Nekrosis hepatosit

Keterangan: Kontrol negatif (mencit yang sehat); Kontrol positif (mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diberi obat apapun); P. Artemisin (mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi Artemisin 0,04 mg/gBB); DK I (mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Kelor 0,125 mg/gBB); DK II (mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Kelor 0,25 mg/gBB) serta DK III (mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Kelor 0,5 mg/gBB

Pada gambar 5.2 rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada pembesaran mikroskop 400 kali pada kelompok kontrol negatif adalah 0,000. Sedangkan rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada pembesaran mikroskop 400 kali pada kelompok kontrol positif adalah 5,974. Pada kelompok perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB, indeks nekrosis hepatosit di bawah pembesaran mikroskop 400 kali adalah 4,684. Pada kelompok perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB, indeks nekrosis hepatosit di bawah pembesaran mikroskop 400 kali adalah 3,124. Sedangkan pada kelompok perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor sebanyak 0,25 mg/gBB, indeks nekrosis hepatosit di bawah pembesaran mikroskop 400 kali adalah 0,68. Pada kelompok terakhir yaitu perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor sebanyak 0,5 mg/gBB, indeks nekrosis hepatosit di bawah pembesaran mikroskop 400 kali adalah 0,782.

Pada gambar 5.2 terlihat bahwa rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit terendah didapatkan pada kelompok mencit perlakuan kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,25 mg/gBB (pada pembesaran mikroskop sebesar 400 kali). Sedangkan rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit tertinggi didapatkan pada kelompok mencit kontrol positif yang diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diberi obat apapun (pada pembesaran mikroskop sebesar 400 kali). Jadi berdasarkan gambar 5.2 didapatkan rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit yang diberi perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan berbagai dosis daun kelor memberikan hasil lebih

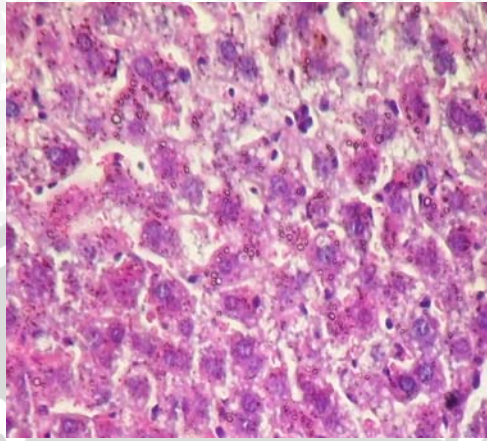
rendah dibandingkan kelompok mencit yang diberi perlakuan artemisin saja. Selain itu bila dibandingkan antara kelompok mencit kontrol positif dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB serta kombinasi antara artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor dengan berbagai dosis, maka indeks nekrosis hepatosit lebih banyak pada kelompok mencit perlakuan positif. Berikut ini adalah hasil gambar nekrosis hepatosit dari masing-masing kelompok perlakuan mencit di bawah pembesaran mikroskop 400 kali.



Gambar 5.3 Histopatologi Hepar Mencit Kontrol Negatif (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar 5.3 menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol negatif pada pembesaran 400 kali. Anak panah berwarna hitam menunjukkan (a) sel kupffer, (b) sel hepar/hepatosit, (c) sinusoid, (d) sel endotel.

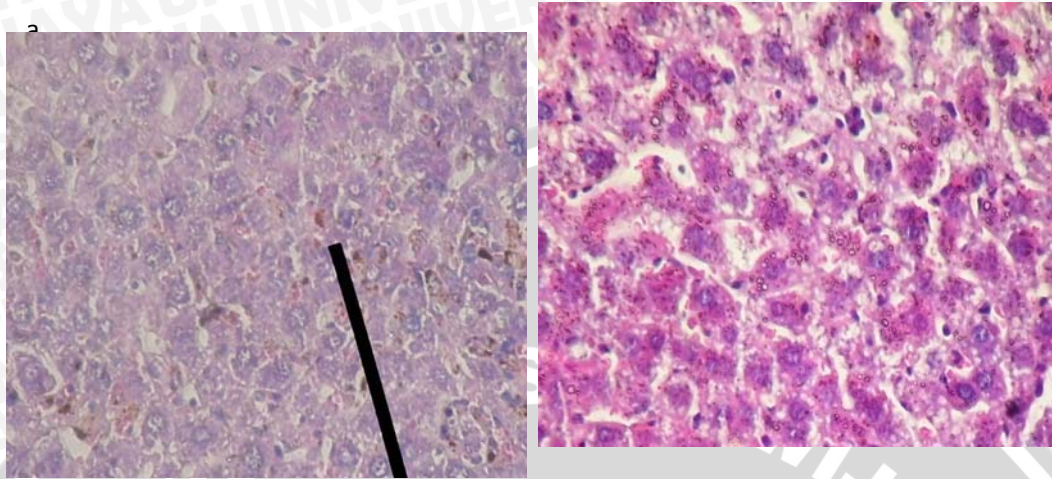
Pada gambar 5.3 tidak tampak nekrosis hepatosit pada hepar mencit kontrol negatif (mencit sehat tanpa diinfeksi *Plasmodium berghei*). Sel hepatosit nampak poligonal, tersusun radier membentuk lempeng hepatosit yang mengelilingi vena sentralis dan dipisahkan oleh sinusoid. Hal ini menunjukkan bahwa dalam keadaan mencit yang sehat tidak didapatkan kerusakan (nekrosis) pada sel-sel heparnya.



Gambar 5.4 Histopatologi Hepar Mencit Kontrol Positif (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar 5.4 menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol positif pada pembesaran 400 kali. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit pada hepar mencit kontrol positif.

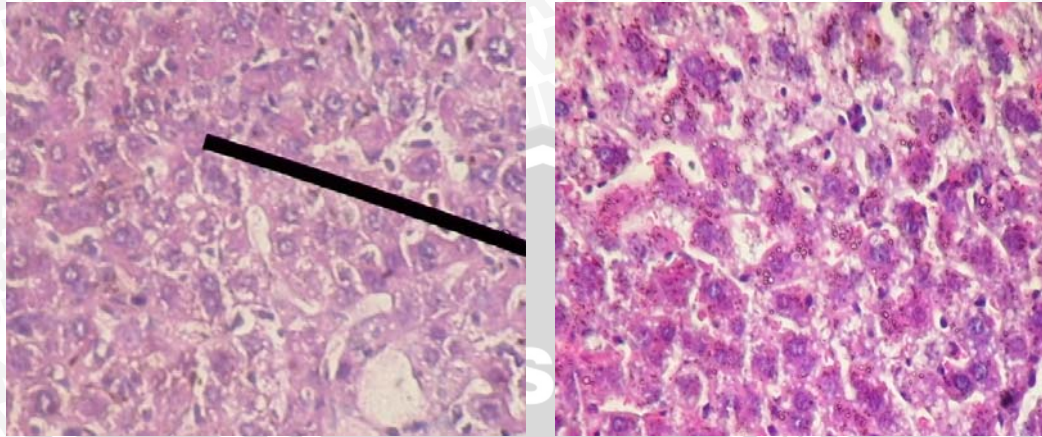
Sedangkan pada gambar 5.4 tampak histopatologi hepar mencit kontrol positif (diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diberi obat apapun) banyak ditemukan nekrosis hepatosit pada hepar mencit kontrol positif. Rata-rata terdapat 5%-7% indeks nekrosis hepatosit per lapangan pandang. Hal ini menunjukkan adanya kerusakan sel-sel hepar dalam bentuk nekrosis hepatosit akibat malaria. Apabila dibandingkan antara gambar 5.3 dengan gambar 5.4 maka terlihat adanya perubahan indeks nekrosis hepatosit yang bermakna di antara kedua gambar tersebut.



Gambar 5.5 Perbandingan Histopatologi antara Nekrosis Hepatosit pada Mencit Perlakuan Artemisin 0,04 mg/gBB dengan Nekrosis hepatosit pada Mencit Kontrol Positif dengan Pengecatan Hematoxylin Eosin (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar 5.5 bagian (a) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit pada sinusoid hepar mencit perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB. Sedangkan gambar 5.5 bagian (b) menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol positif. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit pada sinusoid hepar mencit kontrol positif.

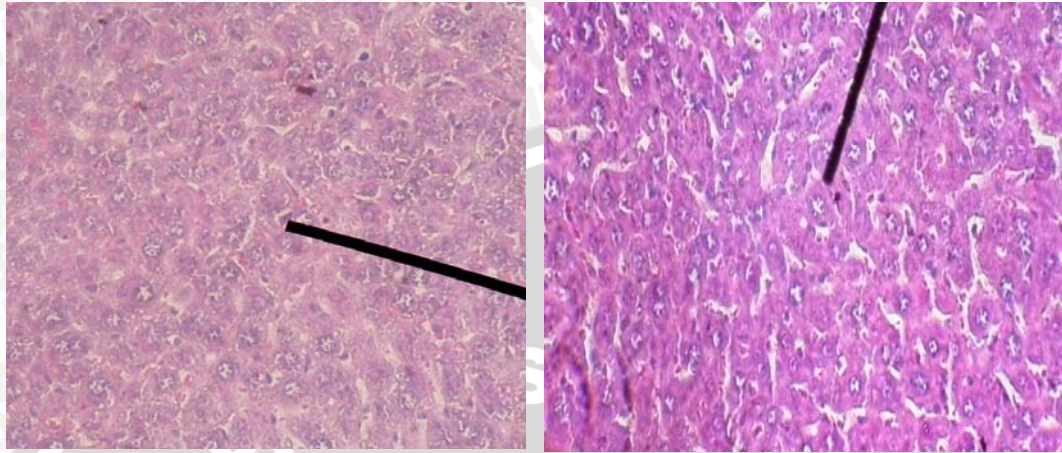
Pada hepar mencit dengan perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB, nampak bahwa terdapat pengurangan indeks nekrosis hepatosit apabila dibandingkan dengan hepar mencit kontrol positif. Pada hepar mencit perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB bisa terlihat bahwa rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit hanya 3%-5,5% per lapangan pandang. Sedangkan pada hepar mencit kontrol positif, rata-rata indeks nekrosis hepatosit dapat mencapai 5%-7% tiap lapangan pandang. Hal ini menunjukkan bahwa adanya penurunan indeks nekrosis hepatosit bila dibandingkan antara mencit perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB dengan mencit kontrol positif.



Gambar 5.6 Perbandingan Histopatologi antara Nekrosis hepatosit pada Mencit Perlakuan Kombinasi Artemisinin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,125 mg/gBB dengan Nekrosis hepatosit pada Mencit Kontrol Positif dengan Pengecatan Hematoxylin Eosin (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar 5.6 bagian (a) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB. Gambar 5.6 bagian (b) menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol positif. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit pada hepar mencit kontrol positif.

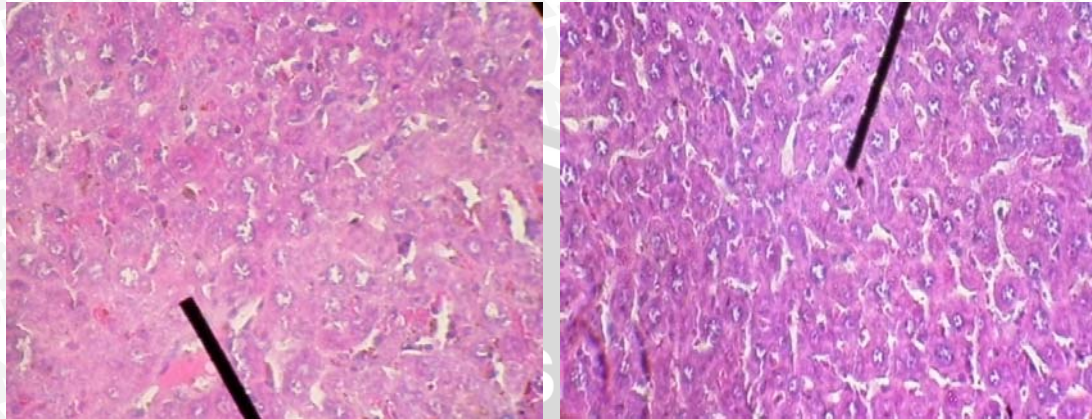
Pada gambar 5.6 terlihat bahwa adanya penurunan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit perlakuan artemisinin 0,04 mg/gBB bila dibandingkan dengan mencit kontrol positif. Nekrosis hepatosit nampak berkurang jumlahnya pada hepar mencit perlakuan artemisinin 0,04 mg/gBB apabila dibandingkan dengan mencit kontrol positif. Rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit perlakuan artemisinin 0,04 mg/gBB berkisar antara 2%-3% per lapangan pandang. Sedangkan rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit kontrol positif adalah 5%-7% per lapangan pandang. Hal ini menunjukkan sudah terdapat perbedaan antara mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB bila dibandingkan dengan mencit pada kelompok kontrol positif.



Gambar 5.7 Perbandingan Histopatologi antara nekrosis hepatosit pada Mencit Perlakuan Kombinasi Artemisinin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,25 mg/gBB dengan Nekrosis hepatosit pada Mencit Kontrol Negatif dengan Pengecatan Hematoxylin Eosin (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar 5.7 bagian (a) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit pada mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB. Gambar 5.6 bagian (b) menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol negatif.

Pada gambar 5.7 terlihat hampir sama antara indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB apabila dibandingkan dengan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa sudah ada perbaikan pada gambaran histopatologis pada hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB. Indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB berkisar antara 0-1% per lapangan pandang. Sedangkan pada hepar mencit kontrol negatif tidak ditemui adanya nekrosis hepatosit. Berdasar hasil tersebut sudah terdapat penurunan indeks nekrosis hepatosi pada mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB.



Gambar 5.8 Perbandingan Histopatologi antara Nekrosis hepatosit pada Mencit Perlakuan Kombinasi Artemisinin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,5 mg/gBB dengan Nekrosis hepatosit pada Mencit Kontrol Negatif dengan Pengecatan Hematoxylin Eosin (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar 5.8 bagian (a) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB. Anak panah berwarna hitam menunjukkan nekrosis hepatosit yang berada pada sinusoid hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB. Gambar 5.6 bagian (b) menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol negatif.

Jika dibandingkan antara gambaran histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB, indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit berkisar antara 0,5%-1% nekrosis hepatosit per lapangan pandang. Sedangkan pada mencit kontrol negatif tidak ditemukan nekrosis hepatosit pada tiap lapangan pandangnya. Hal ini menandakan sudah ada penurunan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit perlakuan kombinasi artemisinin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB. Berarti sudah ada perbaikan yang bermakna pada gambaran histopatologis pada dosis kombinasi tersebut dan sudah adanya penurunan indeks nekrosis hepatosit.

Hasil penelitian ini diuji normalitas distribusi data dengan menggunakan Shapiro Wilk dan Kolmogorov Smirnov. Didapatkan bahwa data hasil penelitian ini adalah normal ($p > 0,05$). Setelah hasilnya diketahui normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian dengan menggunakan *Levene test* untuk menguji

homogenitas dari varian data hasil penelitian. Berdasarkan hasil pengujian *Levene test*, data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian yang sama ($p=0,240$). Oleh karena data hasil penelitian ini memiliki distribusi yang normal dan varian yang homogen, maka pengujian hasil penelitian ini dapat dilanjutkan dengan pengujian *One Way ANOVA*.

Uji ANOVA (*Analysis of Variance*) yang terlampir pada lampiran digunakan untuk menguji signifikansi dan mengambil kesimpulan setelah data terbukti homogen. Uji ini tergolong analisis komparatif lebih dari dua variabel atau lebih dari dua rata-rata. Tujuannya ialah untuk membandingkan lebih dari dua rata-rata. Dari hasil uji ANOVA didapatkan nilai rata-rata indeks nekrosis hepatosit pada keenam kelompok mencit memang berbeda ($p=0.000$). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test (Least Significant Difference)* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Pada analisis ini digunakan *Tukey HSD test* yang hasilnya terdapat pada lampiran.

Tabel 5.3 Perbandingan Signifikan Antar Kelompok Perlakuan Mencit

Kelompok	Negatif	Positif	Artemisin	DK I	DK II	DK III
----------	---------	---------	-----------	------	-------	--------

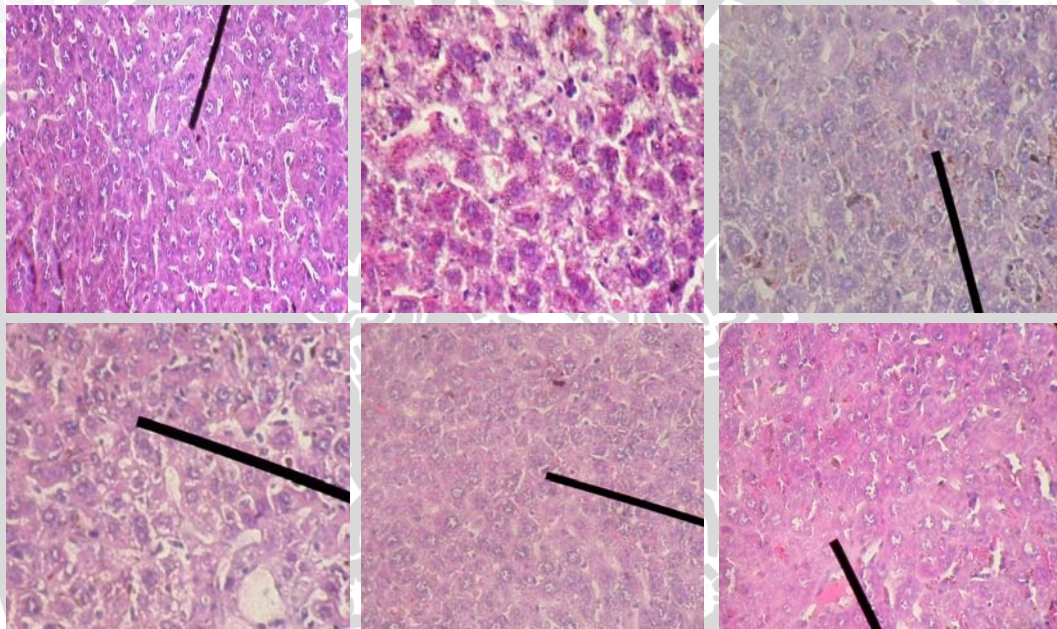
Negatif	-	0.000	0.000	0.000	0.122	0.054
Positif	0.000	-	0.000	0.000	0.000	0.000
Artemisin	0.000	0.000	-	0.000	0.000	0.000
DK I	0.000	0.000	0.000	-	0.000	0.000
DK II	0.122	0.000	0.000	0.000	-	0.999
DK III	0.054	0.000	0.000	0.000	0.999	-

Hasil signifikansi uji *Tukey HSD* dapat dilihat pada tabel 5.1. Pada tabel tersebut menunjukkan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif berbeda dengan signifikansi 0,000. Sedangkan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit kelompok kontrol negatif terhadap kelompok DK II (perlakuan kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,25 mg/gBB) dan kelompok DK III (perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,5 mg/gBB) memiliki hasil yang tidak ada beda ($p>0,05$) yaitu dengan tingkat signifikansi secara berturut-turut 0,122 dan 0,054. Indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit kelompok DK II (perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB) bila dibandingkan dengan kelompok mencit DK III (perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,5 mg/gBB) juga memiliki hasil yang tidak ada beda ($p>0,05$) yaitu dengan tingkat signifikannya 0,999. Sedangkan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit perlakuan artemisin 0,04mg/gBB memiliki hasil yang signifikan berbeda ($p<0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok mencit DK I (perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB), DK II(perlakuan kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,25 mg/gBB), dan DK III(kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5

mg/gBB). Pada kelompok mencit DK II (perlakuan kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,25 mg/gBB) serta DK III (perlakuan kombinasi Artemisin 0,04 mg/gBB dan Daun Kelor 0,5 mg/gBB) nampak ada beda yang signifikan bila dibandingkan dengan nekrosis hepatosit pada hepar mencit perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB dan DK I (perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB). Indeks nekrosis hepatosit pada mencit kelompok kontrol positif bila dibandingkan dengan indeks nekrosis hepatosit pada mencit perlakuan artemisin serta kombinasi artemisin dan daun kelor dengan berbagai dosis (0,125 mg/gBB ; 0,25 mg/gBB ; 0,5 mg/gBB) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) dengan tingkat signifikan yaitu 0.000

Untuk melengkapi hasil dari uji *Tukey HSD* digunakan *Homogeneous Subsets* yang terdapat pada lampiran. Uji ini digunakan untuk mencari grup atau subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata (*Mean Difference*) yang tidak berbeda secara signifikan. Pada subset 1 menunjukkan tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok DK I (kombinasi artemisin dan daun kelor 0,25 mg/gBB), dan DK III (kombinasi artemisin dan daun kelor 0,5 mg/gBB). Pada subset 2 terdapat satu kelompok, yaitu kelompok perlakuan kombinasi artemisin dan daun kelor 0,125 mg/gBB. Sedangkan pada subset 3 dan 4 hanya terdapat masing-masing satu kelompok yaitu kelompok perlakuan artemisin pada subset 3 dan kelompok kontrol positif pada subset 4. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan DK II (kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB) dan DK III (kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB) memiliki hasil yang sudah mendekati normal dan menunjukkan tingkat signifikan yang baik.

Dari hasil-hasil tersebut terlihat bahwa indeks nekrosis hepatosit pada kelompok perlakuan artemisin dan kelompok perlakuan kombinasi artemisin dengan 3 dosis daun kelor yang berbeda cenderung menurun. Apalagi dengan adanya kombinasi artemisin dengan daun kelor dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit sampai mendekati normal. Berikut ini adalah kumpulan 6 gambar histopatologi hepar mencit.



Gambar 5.9 Perbandingan Gambar Histopatologi Hepar Mencit pada 6 kelompok (Pembesaran 400 kali)

Keterangan : Gambar (a) menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol negatif. Gambar (b) menunjukkan histopatologi hepar mencit kontrol positif, Gambar (c) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan artemisin. Gambar (d) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisin dan daun kelor 0,125 mg/gBB. Gambar (e) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisin dan daun kelor 0,25 mg/gBB. Gambar (f) menunjukkan histopatologi hepar mencit perlakuan kombinasi artemisin daun kelor 0,5 mg/gBB.

BAB VI

PEMBAHASAN

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium* sp. pada saliva nyamuk *Anopheles* betina dan banyak terdapat pada daerah tropis, salah satunya di Indonesia. Insiden malaria di Indonesia sebesar 6 juta kasus setiap tahun dengan angka mortalitas 700 kasus setiap tahunnya. Daerah endemik malaria di Indonesia mulai meluas di daerah Indonesia bagian timur (Maluku, Nusa Tenggara, Papua) dan pesisir Jawa bagian selatan dan diperkirakan semakin banyak penduduk yang hidup di daerah endemik malaria. (Dale *et al.*, 2005; Elyazar, 2011).

Golongan artemisin (ART) telah dipilih sebagai obat utama karena efektif dalam mengatasi plasmodium yang resisten dengan pengobatan. Selain itu artemisin juga bekerja membunuh plasmodium dalam semua stadium termasuk gametosit. Dan juga efektif terhadap semua spesies, *P. Falciparum*, *P. Vivax* maupun lainnya (Kasper *et al.*, 2005). Artemisin memiliki kemampuan menurunkan jumlah parasit lebih cepat dibandingkan obat anti malaria yang lain yaitu dengan melewati membran eritrosit sehat dan yang terinfeksi parasit dan mengikat hemoglobin (yang terdapat dalam sel darah merah) atau hemozoin (yang terdapat dalam parasit malaria). Artemisin juga meningkatkan radikal bebas sehingga terjadi kerusakan pada membran parasit yaitu mitokondria, retikulum endoplasma kasar, dan membran plasma (Gordji, 2001). Akan tetapi penggunaan golongan artemisinin secara monoterapi juga akan mengakibatkan rekrudensi, karenanya WHO memberikan petunjuk penggunaan artemisinin dengan mengkombinasikan dengan obat antimalaria lain, sehingga disebut

Artemisinin based Combination Therapy (ACT). Resistensi terhadap ACT juga telah dilaporkan pada beberapa kasus yaitu terhadap 4 Aminokuinolin (klorokuin dan amodiakuin) diberbagai wilayah dunia (WHO,2012). Selain itu, terapi ACT ternyata memiliki beberapa efek samping, yaitu pasien dapat mengalami nyeri sendi dan kehilangan nafsu makan. Pada penggunaan terapi ACT seperti artesunate dan amodiakuin, pasien dapat mengalami efek samping yaitu kelemahan pada tubuh, gangguan pada telinga dan mata, nyeri pada abdomen, pruritis atau gatal, dan pusing. Sedangkan pada penggunaan terapi kombinasi artesunate dengan pyrimethamine/sulfadoxine penderita bisa mengalami ruam pada kulit. Terapi ACT yang lain, seperti artemeter dan lumefantrin akan banyak mengalami nyeri pada abdomen (Adisa, 2008). Tingginya angka resistensi dan efek samping pada pengobatan malaria saat ini memungkinkan tanaman herbal menjadi pilihan pengobatan karena akan memberikan efek samping yang lebih ringan. Daun kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu tanaman herbal yang dapat dijadikan sebagai kombinasi karena kemampuannya sebagai antioksidan dan scizontisidal (Chumark, 2005; Ochechukwu, 2013).

Moringa oleifera kaya akan vitamin A, vitamin B1 (thiamin), vitamin C, vitamin E, arginin, beta-sitosterol, *caffeoylquinic acid*, kalsium, tembaga, sistin, omega 3, omega 6, omega 9, *glutathion*, histidin, *Indole Acetic Acid*, *Indoleacetonitrile*, Isoleusin, Kaempeferol, Leusin, Magnesium, *Oleic-Acid*, *Phenylalanine*, Potasium, Quercetin, Rutin, Selenium, Stigmasterol, Sulfur, Triptofan, Tirosin, Zeatin, dan seng. *Moringa oleifera* juga mengandung flavonoid yang merupakan senyawa polifenol. Jenis flavonoid yang terdapat dalam *Moringa oleifera* adalah quercetin dan kaemperferol. Quercetin merupakan antioksidan kuat, dengan kekuatan 4-5 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin C

dan vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan potensial (Boyer *et al.*, 2005). Selain itu kadar vitamin C daun kelor segar setara dengan 7 kali vitamin C buah jeruk, yang berperan dalam metabolisme besi dan peningkatan hemoglobin tubuh (Nambiar *et al.*, 2010).

Hepar adalah organ yang penting dalam respon parasitemia malaria karena hepar adalah organ utama yang terlibat dalam reproduksi aseksual parasit malaria dan karena aktivitas parasit dan respon imun host dapat menyebabkan inflamasi kronik pada hepar (Pan *et al.*, 2010). Studi histologi nekrosis hepar merupakan indikator yang kuat untuk mengungkapkan kerusakan hepar akibat parasit malaria dan efek obat dalam mengurangi kerusakan tersebut (Soniran, 2011). Nekrosis pada sel hepar berhubungan dengan adanya aktivitas fagositik terhadap parasit yang menyebabkan terbentuknya metabolik perusak yaitu *Reactive Oxygen Species (ROS)* sehingga mengakibatkan deplesi ATP. Deplesi ATP inilah yang kemudian menyebabkan nekrosis hepatosit (Nines *et al.*, 2013). Nekrosis hepatosit dapat dilihat dengan menggunakan pewarnaan *hematoxylin eosin* melalui mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali (Matsumoto *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai pengaruh kombinasi artemisin dan daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap perubahan indeks nekrosis hepatosit pada mencit galur balb/c ini menggunakan 30 ekor mencit yang terdiri atas 6 kelompok perlakuan. Kelompok I adalah mencit yang tidak diinfeksi *Plasmodium berghei* yang disebut sebagai kontrol negatif, kelompok II adalah mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* yang disebut sebagai kontrol positif, kelompok III adalah mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi perlakuan dengan Artemisin sebanyak 0,04 mg/gBB, sedangkan kelompok IV sampai dengan VI (3 kelompok)

merupakan mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi perlakuan kombinasi ekstrak daun kelor (0,125 , 0,25 , dan 0,5 mg/gBB) dan Artemisin sebanyak 0,04 mg/gBB. Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi artemisin dan daun kelor memiliki pengaruh terhadap penurunan indeks nekrosis pada sel-sel hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Perbandingan indeks nekrosis hepatosit mencit kontrol negatif (tidak diinfeksi *Plasmodium berghei*) terhadap mencit kontrol positif (mencit yang telah diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa pengobatan) memiliki perbedaan nekrosis hepatosit yang signifikan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa nekrosis hepatosit pada sel-sel hepar mencit merupakan akibat dari inokulasi *Plasmodium berghei*. Temuan ini sesuai dengan penelitian Ute Frevert pada tahun 2005 yang berjudul “*Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver*” dimana ditemukan nekrosis hepatosit pada mencit yang diinokulasi sporozoit *Plasmodium berghei* secara intravena. Sedangkan pada kontrol negatif (tidak diinokulasi *Plasmodium berghei*) tidak ditemukan adanya kerusakan sel hepar (nekrosis). Hasil pada mencit kelompok artemisin (perlakuan artemisin 0,04 mg/gBB) menunjukkan indeks nekrosis hepatosit yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan mencit kelompok kontrol positif. Hasil ini mengindikasikan bahwa artemisin sebagai obat yang efektif dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang berjudul “*Comparative Study on the Effects of Chloroquine and Artesunate on Histopathological Damages Caused by Plasmodium berghei in Four Vital Organs of Infected Albino Mice*” oleh Soniran *et al.*, pada tahun 2012 dimana mencit yang mendapat pengobatan artesunat (golongan artemisin) juga mengalami penurunan indeks nekrosis hepatosit. Sedangkan pada mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB

dan daun kelor berbagai dosis (0,125 mg/gBB, 0,25 mg/gBB, dan 0,5 mg/gBB) juga menunjukkan hasil penurunan indeks nekrosis hepatosit yang signifikan ($p < 0,05$). Namun apabila dibandingkan antara mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,125 mg/gBB, mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB, serta mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB maka indeks nekrosis hepatosit yang paling signifikan ($p < 0,05$) adalah pada mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB. Adanya penurunan indeks nekrosis disebabkan karena kandungan polifenol sebagai antioksidan dalam *Moringa oleifera* yang dikombinasikan dengan artemisin. Pada penelitian Aidoo *et al.*, pada tahun 2012 yang berjudul “*Natural cocoa ingestion reduced liver damage in mice infected with Plasmodium berghei*” terungkap bahwa kandungan polifenol dalam cocoa terbukti sebagai antioksidan yang dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit. Sedangkan pada mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB menunjukkan adanya peningkatan rerata indeks nekrosis hepatosit bila dibandingkan dengan kelompok mencit perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB, namun karena pada uji statistik tidak menunjukkan berbeda secara signifikan sehingga hasil indeks nekrosis kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB merupakan variabel normal. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya “*Anti-Ulcer and Antioxidant Activity of Moringa oleifera (Lam) Leaves Against Aspirin and Ethanol Induced Gastric Ulcer in Rats*” oleh Verma *et al*, 2012, dimana dosis daun kelor (0,5 mg/gBB) dapat meningkatkan efek antioksidan pada ekstrak *Moringa oleifera* tersebut.

Pengaruh kombinasi artemisin dengan daun kelor terhadap perubahan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* telah menunjukkan hasil adanya potensi serta efektifitas kombinasi daun kelor yang mengandung polifenol sebagai antioksidan dengan artemisin dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Pada penelitian sebelumnya yang berjudul "Natural cocoa ingestion reduced liver damage in mice infected with *Plasmodium berghei*" yang dilakukan oleh Aidoo *et al.*, pada tahun 2012 juga mengungkapkan bahwa kandungan polifenol dalam cocoa terbukti sebagai antioksidan yang dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit.

Moringa oleifera mengandung senyawa-senyawa antioksidan, diantaranya adalah vitamin C, E dan flavonoid. Flavonoid dalam daun kelor adalah *quercetin* dan kaemperferol. Flavonoid berperan penting sebagai antioxidant, antiinflamasi, antitumor, antiviral, dan imunomodulator (Oliveira J.E, 2002). Selain itu ternyata *quercetin* dan kaemperferol bisa menghambat radikal O₂ yang dihasilkan oleh sel kupffer serta menghambat sintesis NO dan INOs. (Vrba *et al.*, 2002). Adanya penurunan ROS serta radikal bebas lain akan menurunkan terbentuknya nekrosis hepatosit. Vitamin C sebagai Antioksidan memberikan perlindungan terhadap stress oksidatif pada infeksi malaria juga berperan penting dalam menunjang penatalaksanaan infeksi malaria (Iyawe dan Onigbinde, 2011).

Pada penelitian ini dapat terlihat bahwa kombinasi artemisin dan daun kelor memiliki efek yang lebih baik terhadap pengurangan nekrosis hepatosit pada hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* apabila dibandingkan dengan pemberian artemisin saja pada mencit. Ketiga dosis kombinasi artemisin

dan daun kelor juga menunjukkan hasil yang efektif dalam mengurangi nekrosis pada sel-sel hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Mencit yang diberi perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB menunjukkan hasil yang paling menurun secara signifikan ($p < 0,05$) apabila dibandingkan dengan kedua dosis kombinasi artemisin dan daun kelor lainnya. Sedangkan pada perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB menunjukkan peningkatan indeks nekrosis hepatosit, walaupun hasilnya menunjukkan tidak ada beda yang signifikan ($p > 0,05$) bila dibandingkan dengan perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB. Hal ini menunjukkan bahwa dosis efektif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,25 mg/gBB.

Penelitian ini didapatkan bahwa pemberian kombinasi artemisin dan daun kelor terbukti dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Namun, dalam penelitian ini belum dapat diketahui dosis optimal, yang bila ditingkatkan tidak memberi efek samping atau justru menjadi toksik. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis kombinasi artemisin dan daun kelor yang optimal dalam mengobati malaria.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Kombinasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan indeks nekrosis hepatosit pada hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.
2. Dosis efektif dalam penelitian ini untuk menurunkan nekrosis hepatosit pada hepar mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* adalah kombinasi artemisin 0,04 mg/g dan daun kelor 0,25 mg/g.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan dosis kombinasi antara artemisin 0,04 mg/g dan daun kelor 0,125 sampai artemisin 0,04 mg/g dan daun kelor 0,25 mg/g untuk mengetahui dosis kombinasi artemisin dan daun kelor yang lebih tepat dan efektif dalam penurunan nekrosis hepatosit pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.
2. Dari hasil rerata indeks nekrosis pada perlakuan kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan daun kelor 0,5 mg/gBB, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah terdapat efek toksik dari kombinasi artemisin dan daun kelor bila dosis perlakuan ditambah.
3. Karena penelitian ini menggunakan metode *hematoxylin eosin* (HE) yang bersifat sangat *gross*, maka perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan metode lain misalnya imunohistokimia untuk mengetahui secara lebih

spesifik kombinasi artemisin dan daun kelor dalam menurunkan indeks nekrosis hepatosit.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, K.A., Lichtman, A.H., and Prober, J.S. 2000. Celluler and Molecular Immunology. 4th ed.
- Adisa, R., Fakeye, T.O., Dike, D. 2008. Evaluation of Adverse Drug Reactions to Artemisinin based Combination Therapy in a Nigeria University Community. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, June 2008; 7 (2): 937-944
- Aidoo, E. *et al.* 2012. Natural cocoa ingestion reduced liver damage in mice infected with Plasmodium berghei (NK65). *Research and Reports in Tropical Medicine Department of Anatomy*.Ghana.
- Antara news.com/news/7066/addressing-malaria-global elimination. diakses pada tanggal 15 Januari 2012.
- Baheti, R., Laddha, P., Gehlot, R.S. 2003. Liver involvement in 12. falciparum malaria; histo-pathological analysis. *JIACM* ;4(1):34-8.
- CDC. 2010. Biology of Malaria.USA. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
- Chen, W.C. *et al.* 2009. Human Heat Shock Protein 27 Overexpressing Mice are Protected Agrainst Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury. *Transplantasion*.2009 May 27;87(10): 1478-1487
- Choidini, P.L., Moody, A.H., Manser DW. 2001. Atlas of Medical Parasitology and Protozoology. Ed ke-4. Philadelphia: Churcill Livingstone.
- Chumark. 2005. The In Vitro and Ex Vivo Antioxidant Properties, Hypolipidaemic, and Antiatherosclerotic Activities of Water Extract of Moringa oleifera Lam. Leaves. *Elsevier*.
- Dale, P. *et al.* 2005. Malaria In Indonesia: a summary of recent research into its environmental relationships. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 36(1): 1-11
- Depkes RI. 2008. Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria Di Indonesia. Direktorat Jendral Pengendalian penyakit dan Penyelamatan Lingkungan Depkes RI.
- Depkes RI. 2009. Profil Kesehatan Indonesia 2008. Jakarta. <http://www.depkes.go.id>.
- Elyazar, I.R.F., Hay, S.I., Baird, J.K. 2011. Malaria Distribution, Prevalence, Drug Resistance and Controls in Indonesia. *Adv. Parasitol*; 74: 41-175

- Enggarfitri, L. et.al. 2008. Efek Kombinasi Artemisinin dan NAC, Menurunkan Kadar Otak dan Paru Mencit yang Diinfeksi N-acetylcysteine Malondialdehyde Plasmodium Berghei. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. XXIV, No. 2.
- Fahey, J.W. 2005. Moringa oleifera: A Review of The Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties Part 1. *Trees for Life Journal*.Pari L, et al. 2007. Antioxidant Activity Of The Crude Extracts Of Drumstick Tree (*Moringaoleifera* Lam.) And Sweet Broomweed (*Scoparia Dulcis* L.) Leaves. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*Vol. 57, No. 2, pp. 203–208.
- Ferreira, J.F.S. et al. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*(15): 3135-3170.
- Fielding, C.A. et al. (2008) IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol* 181: 2189–2195.
- Figtree, M. et al. 2010. Plasmodium knowlesi in Human, Indonesian Borneo. *Emerging Infectious Diseases*.vol.16,no.4.
- Frevert, U. 2004.Sneaking in through the back entrance:the biology of malaria liver stages.TRENDS in Parasitology Vol.20 No.9;417-424
- Frevert, U. et al. 2005.Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver.Department of Medical and Molecular Parasitology, New York University School of Medicine, New York, New York, United States of America.PLoS Biol 3(6): e192.
- Foidl, N., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 2001. *The Potential of Moringa Oleifera for Agricultural and Industrial Uses*, (Online), (www.moringanews.org/actes/foidl_en.doc, diakses 22 November 2009).
- Fuglie, L. 2001. *The Miracle tree: The Multiple Attributes of Moringa*,Dakar.
- Gladstone & Nancy. 2010. Moringa oleifera, (Online), (www.paceproject.net, diakses 26 Oktober 2010).
- Guyton, Arthur, C., Hall, J.E. 1997. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 29. AlihBahasa: Irawati setiawan et. al. Jakarta: EGC. Hal. 1103-1110.
- Gordi, T. 2001. Clinical Pharmacokinetics of the Antimalarial Artemisinin Based on Saliva Sampling. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* 250. 56 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4956-5.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. 3: 23-27.

Hanousek Margaret. *et al.* 2011. Inhibition of Murine Skin Carcinogenesis by Freeze-Dried Grape Powder and Other Grape-Derived Major Antioxidants. *Nutrition and Cancer*, 63(1): 28–38.

Hariyanto, P. N. 2000. Malaria, Epidemiology, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganannya. Cetakan I, EGC.

Hunt, N.H., and Neil, A.L. 1992. Free Radicals and Antioxidants in Malaria. Lipid Soluble Antioxidants : Biochemistry and Clinical Application. A.S.H Ong & L. Packer (eds.) Birkhauser Verlag. Basel/Switzerland.

Hilau, A., Nacoulma, O.G., Guguemde, T.R. 2006. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amarantus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L in mice Blazquez.S, Thiberge.S, Amino.R, dan Menard.R, 2008. In vivo imaging of preerythrocytic forms of murine Plasmodium parasites dalam Methodes in Malaria research 5th. Moll Kirsten, Ljungstrom I, Petmann H, Schert A, Wahlgren M (ed) BioMalPar, Paris, France: 148-152.

Iyawe, H.O.T., & Onigbinde, A.O. 2009. Ascorbic and Folic Acids Intervention in *P. berghei* Induced Oxidative Stress in Mice. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. Nigeria. 1(2): 40-46,

Iyawe, H.O.T., & Onigbinde, A.O. 2011. Research Paper The role of ascorbic acid in the treatment of Plasmodium Berghei infected mice. Department of Biochemistry Ambrose Alli University Nigeria. *African Journal of Biochemistry Research*, 3 (11); 375-378

Janse, C., & Waters, A. 2002. The Plasmodium berghei research model of malaria. Leiden University Medical Centre (Leiden University Malaria Research Group (LMRG), Leiden, The Netherlands: <https://www.lumc.nl/con/1040/81028091348221/810281121192556/811070740182556/>

Jambou, R. *et al.* 2011. In vitro culture of Plasmodium berghei-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. <http://www.malariajournal.com/content/10/1/346>.

Jones, S.A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 175: 3463–3468.

Junqueira, M.I.M. 2007. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of Malaria. *Current Clin Pharmacology* ; 2:59-73.

Kasper, Hauser, Braunwald, Longo, Fauci, Jameson. 2005. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th. p.1218-1232.

- Kasper, Pauci, Brounward, 2008. Harrison's Principles Of Internal Medicine: Infectious disease. 17th Edition. Vol 1. The Mc grawhill. USAPan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010;1(1):15–31.
- Kasolo, J.N. 2010. Phytochemicals and uses of Moringa oleifera leaves in Uganda and rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(9): hal. 753-757.
- Klotz, C., & Frevert, U. 2008. Plasmodium yoelii sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *International Journal Parasitology.* 2008 December; 38(14): 1639–1650.
- Koruthu, D.P, Manivaman, N.K, Gopinath, A. 2011. Antibacterial Evaluation, Reducing Power Assay And Phytochemical Screening Of Moringa Oleifera Leaf Extracts: Effect Of Solvent Polarity. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research.* India, 2(11); 2991-2995.
- Luqman, S. *et al.* 2012. Experimental Assessment of Moringa oleifera Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol.2012. id 519084.
- Lou, J., Lucas, R., Grau, G.E., 2001. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 810–820.
- Lobel, H.O., Campbell, C.C. 1998. Malaria Prophylaxis and distribution of drug resistance. *Clinics in Tropical Medicine and Communicable Diseases.* 1:225-242.
- Matsumoto, T. *et al.*, 2005. Splenic Transposition is Superior to Caudal Shunt as a Model of Murine Total Hepatic Ischemia. *Laboratory Investigation.* 85: 90–98
- McLoughlin, R.M., Witowski, J., Robson, R.L., Wilkinson, T.S., Hurst, S.M. *et al.* 2003. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest.* 112: 598–607.
- Mota, M.M., & Ana, R. 2010. "Migration through Host Cells by Apicomplexan Parasites." *Microbes and Infection*, (online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170929>, diakses pada tanggal 3 Desember 2012),
- Nambiar, V.S., Parnami, S., and Guin, P. 2010. Effect Of Drumstick Leaves Supplementation on Hematological Indices of Young Girls. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives;* 1(2): 261 – 266.

Natadisastra, D. & Agoes, R. 2009. PARASITOLOGI KEDOKTERAN, Ditinjau dari Organ Tubuh yang Diserang. EGC.

Nicholas, J.W., Joel, G.B. 2005. Malaria and Babesiosis : Disease caused by Red Blood Cell Paracites. In Harison's Internal Principles of Medicine, 16th ed. Hal.1218-1229.

Okechukwu, P.C., Okwesili, F.C., Parker, J.E., Christian, O.E., Abubakar, B., Emmanuel, O.C., and Cyril, A.C. 2013. Anti-Malaria and Hematological Analyses of Ethanol Leaf Extract of Moringa Oleifera on Malaria Infected Mice. Nigeria.

Ogubajo, A. 2011. Migration of Plasmodium Sporozoite through Host Cells. JSNMA, 2012.

Oliveira, J.E., Watson, G.D., Grant, H.M. 2002. Metabolism of Quercetin and Kaempferol by Rat Hepatocytes and the Identification of Flavonoid Glycosides in Human Plasma. *Xenobiotica*, 2002, vol. 32, no. 4, 279±287.

Olurisha, T.O., Kwanashie, H.O., Anuka, J., Muktar, H., Bisalla, M. 2011. Histopathological effects of sub-chronic lamivudine-artesunate co-administration on the liver of diseased adult Wistar rats. *North American Journal of Medical Sciences*. Vol.3(7).

Pan, M.H., Lai, C.S. and Ho, C.T. 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*, 1:15-31.

Pari, L. *et al.* 2007. Antioxidant Activity Of The Crude Extracts Of Drumstick Tree (*Moringaoleifera* Lam.) And Sweet Broomweed (*Scoparia Dulcis* L.) Leaves. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* Vol. 57, No. 2, pp. 203–208

Prudencio, M. *et al.* 2006. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *NATURE REVIEWS*. vol.4;849-856

Putri, O.D. 2011. Sejuta khasiat daun kelor. *Berlian media*. Jakarta

Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi*. EGC. 1:26-28.

Schwenk, R.J. and Richie, T.L. 2011. Protective Immunity to Pre-erythrocytic Stage of Malaria. *University of Labranca-Lincoln*. 30(10).hal.9.

Sardjono, T.W. dan Fitri, L. 2007. Malaria, Mekanisme terjadinya penyakit dan pedoman penanganannya. *Laboratorium Parasitologi*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.

- Sohail, M., Kaul, A., Raziuddin, M., Adak, T. 2007. Decreased Glutathione-S-transferase Activity: Diagnostic and protective role in vivax malaria. *Clin Biochem* 40: 377-382
- Song, G., Koksal, A.C., Lu, C., Springer, T.A. 2012. Shape Change in the Receptor for Gliding Motility in Plasmodium Sporozoites. *PNAS*, vol.109 no.52.
- Soniran, O.T., Idowu, O.A., Ajayi, O.L., Olubi, I.C. 2012. Comparative Study on the Effects of Chloroquine and Artesunate on Histopathological Damages Caused by Plasmodium berghei in Four Vital Organs of Infected Albino Mice. Taramelli, D (Eds). *Malaria Research and Treatment*.
- Sudoyo, A.W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., Setati. S. 2009. Dalam buku ajar Ilmu Penyakit Dalam. Edisi V(III): hal.2813-2835.
- Sundari, S. *et al.*1997. Inokulasi Plasmodium berghei pada Beberapa Strain Mencit. *CDK* 118:35-37.
- Sutantanto, *et al.*2009. *Parasitologi Kedokteran*. Balai penerbit FKUI.
- Syamsudin. 2005. Mekanisme Kerja Obat Antimalaria. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Universitas Pancasila Jakarta. Vol.3 No.1 ; 37-40
- Taylor-Robinson, A.W. 2000. The sequestration hypothesis: an explanation for the sensitivity of malaria parasites to nitric oxide-mediated immune effector function in vivo. *Medical Hypotheses*. 54 (4). Pages 638-641.
- Thaithong, S. 1983. Clones of different sensitivities in drugresistant isolates of Plasmodium falciparum. *Bulletin of the World Health Organization* 1983;61:709-712.
- Verma, V.K., Singh, N., Saxena, P., and Singh, R. 2012. Anti-Ulcer and Antioxidant Activity of Moringa Oleifera(Lam) Leaves against Aspirin and Ethanol Induced Gastric Ulcer in Rats. *International Research Journal of Pharmaceuticals*.2(2):46-57.
- Vrba Jirí & Modrianský Martin. 2002. Oxidative Burst of Kupffer Cell: Target for Liver Injury Treatment. *Biomed. Papers* 146(2), 15-20 (2002).
- WHO.2010.Guidlines for the Treatment of Malaria.Edisi II, hal.13.
- Widodo, D., Pribadi, M.J., Zulkarnain, I. Malaria serebral. 2000. *Maj 3. Kedokteran Indonesia*.;50:232-8.
- World Health Organization (WHO). WHO Global Malaria Programme. 2010.

