



LAPORAN PENELITIAN
DOSEN MUDA
Tahun Anggaran 2005

EFEK SINERGIS *CHLOROQUINE* DAN *N-ACETYL
CYSTEINE* TERHADAP PENURUNAN AKTIVITAS RADIKAL
BEBAS HEPAR DAN PENINGKATAN AKTIVITAS
FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL MENCIT BALB/C
YANG DIINFEKSI *Plasmodium berghei*

Oleh :
Agustin Iskandar, dr, MKes
Loeki Enggarfitri, DR, dr, Mkes

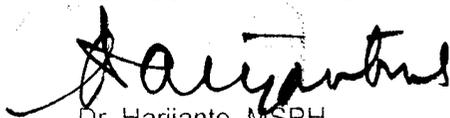
Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada
Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Dengan Surat Perjanjian
Pelaksanaan Penelitian Nomor : 039/SPPP/PP/DP3M/IV/2005

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOPEMBER 2005

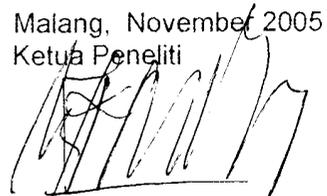
**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

- 1.a Judul : Efek Sinergis *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* terhadap Penurunan Aktivitas Radikal Bebas Hepar dan Peningkatan Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal pada Mencit Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*
- b. Kategori Penelitian : I/III/III
2. Ketua Peneliti
- a. Nama : Agustin Iskandar, dr. MKes
- b. Jenis kelamin : Perempuan
- c. Pangkat/Gol./NIP : Ass. ahli madya/ IIIb/ 132 231 569
- d. Jabatan fungsional : staf pengajar Lab. Parasitologi
- e. Fakultas/ Jurusan : Kedokteran Umum
- f. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya Malang
- g. Pusat Penelitian : Lab. Biomedik FK Unibraw
3. Jumlah tim peneliti : 2 orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Biomedik dan Lab. Farmakologi FK
5. Jangka Waktu Penelitian : 8 bulan
6. Biaya Penelitian : Rp. 6.000.000,- (enam juta rupiah)

Mengetahui
Dekan
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya


Dr. Harijanto, MSPH
NIP. 130 355 401

Malang, November 2005
Ketua Peneliti


Agustin Iskandar, dr. MKes
NIP. 132 231 569

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian Universitas Brawijaya


Dr. Ir. Syamsulbahri MS
NIP. 130 935 096



RINGKASAN

EFEK SINERGIS *CHLOROQUINE* DAN *N-ACETYL CYSTEINE* TERHADAP PENURUNAN AKTIVITAS RADIKAL BEBAS HEPAR DAN PENINGKATAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Plasmodium berghei*

Agustin Iskandar, Loeki Enggarfitri

Tanggal penulisan laporan November 2005 ; Tebal laporan 52 halaman

Malaria masih merupakan masalah utama di dunia. Kerusakan oksidatif akibat infeksi malaria dapat menyebabkan komplikasi yang sering menimbulkan kematian. Hepar merupakan salah satu organ yang berperan penting pada infeksi malaria. Selain berperan dalam siklus hidup parasit malaria, hepar juga merupakan salah satu target organ yang sering mengalami komplikasi pada malaria. *Chloroquine* masih merupakan *drug of choice* dalam pengobatan malaria. *N-Acetyl Cysteine* selain sebagai antioksidan juga merupakan imunomodulator serta mempunyai potensi dalam pengobatan malaria. *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* akan berinteraksi baik secara farmakokinetik maupun farmakodinamik sehingga diharapkan dapat memberikan efek sinergi dalam menurunkan parasitemia, menurunkan aktivitas radikal bebas pada hepar dan meningkatkan aktivitas makrofag mencit selama infeksi *Plasmodium berghei*. **Metode** penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan *Plasmodium berghei*. Hewan uji adalah mencit galur BALB/c umur 6-8 minggu dengan berat badan 20-30 gram. Setelah diinfeksi *Plasmodium berghei*, mencit dibagi dalam 8 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok *Chloroquine*, kelompok NAC 0,25 mg/gBB, kelompok NAC 0,5 mg/gBB, kelompok NAC 1 mg/gBB, kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC 0,25mg/gBB, kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC 0,5 mg/gBB dan kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC 1 mg/gBB. Pada hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-7 setelah pemberian obat, mencit dimatikan dan diperiksa derajat parasitemia, kadar *malondialdehyde* (MDA), kadar glutathione (GSH) dan dilakukan kultur makrofag peritoneal.

Hasil penelitian : menggunakan uji MANOVA dan Tukey HSD, terdapat penurunan kadar MDA hepar pada hari ke-3 pada kelompok kombinasi klorokuin

dan NAC 1 mg/gBB, dan pada hari ke-7 pada kelompok kombinasi klorokuin dan NAC 0,5mg/gBB, serta pada kelompok kombinasi klorokuin dan NAC 1 mg/gBB. Kadar GSH mengalami peningkatan pada hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-7 pada kelompok NAC serta pada kelompok kombinasi klorokuin dan NAC semua dosis. Aktivitas makrofag peritoneal mengalami peningkatan signifikan pada hari ke-7 antara kelompok kontrol dengan kelompok NAC dan kelompok kombinasi *Chloroquine* dan NAC. **Kesimpulan** : Hasil penelitian ini membuktikan bahwa terdapat efek sinergi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* dalam menurunkan aktivitas radikal bebas hepar dan terdapat efek potensiasi dalam meningkatkan aktivitas makrofag peritoneal pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

SUMMARY

Malaria is still a health problem around the world. Oxidative damage caused by malaria infection can cause complication and death. Liver is one of target organs which is important in malaria infection. Combination of chloroquine and N-Acetyl Cysteine which is an antioxidant were expected to decrease free radicals activity and to increase phagocytosis activity of peritoneal macrophage.

Objective : The aim of this research was to know the synergic effect of *Chloroquine* and *N-Acetyl Cysteine* towards free radical activity of liver and phagocytosis activity of peritoneal macrophage in mice infected with *Plasmodium berghei*.

Method for this experiment was experimental laboratory research used *Plasmodium berghei* and mice strain BALB/c, 6-8 weeks old, with body weight 20-30 gram. After infected with *Plasmodium berghei*, mice divided into 8 groups : control, chloroquine, NAC 0,25 mg/gBB; NAC 0,5 mg/gBB; NAC 1 mg/gBB and combined drugs given chloroquine and NAC 0,25 mg/gBB; NAC 0,5 mg/gBB; NAC 1 mg/gBB. In 3rd, 5th, and 7th day after treatment, mice were killed and examined parasitemia level, Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) content, and phagocytosis activity of peritoneal macrophage.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	iii
PRAKATA.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	19
IV. METODE PENELITIAN.....	20
V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	27
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil pemeriksaan Kadar MDA hepar pada kelompok Kontrol, Kelompok <i>Chloroquine</i> , Kelompok NAC dan Kelompok Kombinasi <i>Chloroquine</i> dan NAC.....	27
Tabel 5.2 Hasil pemeriksaan Kadar GSH hepar pada kelompok Kontrol, Kelompok <i>Chloroquine</i> , Kelompok NAC dan Kelompok Kombinasi <i>Chloroquine</i> dan NAC.....	29
Tabel 5.3 Jumlah rata-rata makrofag yang memakan partikel latex pada kelompok Kontrol, Kelompok <i>Chloroquine</i> , Kelompok NAC dan Kelompok Kombinasi <i>Chloroquine</i> dan NAC.....	32
Tabel 5.4 Hasil Uji Perbandingan berganda Tukey untuk variable jumlah makrofag.....	37

DAFTAR GAMBAR DAN GRAFIK

	Halaman
Gambar 2.1 Siklus Hidup <i>Plasmodium</i>	8
Gambar 2.2 Respon Imun terhadap Infeksi Malaria.....	9
Gambar 2.3 Proses Opsonisasi dan Fagositosis.....	11
Gambar 2.4 Peran ROS dalam Patologi Malaria.....	13
Gambar 2.5 Konsumsi Oksigen, Degradasi Hemoglobin dan Stress Oksidatif pada Eritrosit yang terinfeksi Parasit.....	14
Gambar 5.1 Sel Makrofag pada mencit galur BALB/c yang diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i>	35
Gambar 5.2 Sel Makrofag pada mencit galur BALB/c yang diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dan diberi <i>Chloroquine</i>	35
Gambar 5.3 Sel Makrofag pada mencit galur BALB/c yang diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dan diberi kombinasi <i>Chloroquine</i> + NAC.....	36
Grafik 5.1 Perbandingan jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan kelompok <i>Chloroquine</i>	33
Grafik 5.2 Perbandingan jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan kelompok NAC.....	33
Grafik 5.3 Perbandingan jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan kelompok <i>Chloroquine</i> + NAC.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

- Lampiran 1 Cara Inokulasi *Plasmodium berghei*
- Lampiran 2 Cara Pemeriksaan Parasitemia
- Lampiran 3 Cara Pemeriksaan Kadar MDA Hepar
- Lampiran 4 Cara pemeriksaan Kadar GSH Hepar
- Lampiran 5 Cara Isolasi dan Kultur makrofag Peritoneal
- Lampiran 6 Hasil Penghitungan kadar MDA
- Lampiran 7 Hasil Penghitungan kadar GSH
- Lampiran 9 Hasil Penghitungan Jumlah makrofag yang memfagositosis latex
- Lampiran 10 Hasil Analisis Data untuk variabel MDA (ANOVA, Tukey HSD dan t test)
- Lampiran 11 Hasil Analisis Data untuk variabel kadar GSH (ANOVA, Tukey HSD dan t test)
- Lampiran 13 Hasil Analisis Data untuk variabel jumlah makrofag/fagositosis (ANOVA, Tukey HSD dan t test)

DAFTAR ISTILAH/SINGKATAN

CD	: <i>Cluster of Difference</i>
COPD	: <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
IL	: <i>Interleukin</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
NAC	: <i>N-Acetyl Cysteine</i>
ODFR	: <i>Oxygen Derived Free Radicals</i>
PRBC	: <i>Parasitized Red Blood Cell</i>
RBO	: Radikal Bebas Oksigen
RESA	: <i>Ring Eritrocyte Surface Antigen</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF	: <i>Tumour Necrosis Factor</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Penyakit malaria masih merupakan masalah kesehatan di dunia, terutama di negara-negara tropis termasuk Indonesia. Serangan malaria mengenai hampir 250 juta penduduk di seluruh dunia, dengan tingkat kematian 1 sampai dengan 2 juta per tahunnya (Abbas, 2000).

Malaria disebabkan oleh protozoa intraseluler dari genus *Plasmodium*. Dari keempat spesies *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum* merupakan spesies yang predominan dan menyebabkan sekitar 120 juta kasus baru dengan angka kematian satu juta setiap tahunnya (Viswanathan, 1998). Spesies ini paling sering menyebabkan komplikasi terutama malaria serebral. Di Indonesia, tingkat mortalitas akibat malaria berat/malaria serebral masih tinggi, yaitu sekitar 20-50% dari seluruh kejadian malaria (Harijanto, 2000)

Plasmodium berghei merupakan salah satu spesies *Plasmodium* yang menginfeksi binatang pengerat (*rodent*). Parasit ini telah lama digunakan sebagai model dalam penelitian malaria. Walaupun tidak bisa menginfeksi manusia, tetapi *Plasmodium berghei* telah terbukti mempunyai sifat yang analog dengan *Plasmodium* yang menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* dan *Plasmodium ovale*. *Plasmodium berghei* mempunyai struktur, fisiologi dan siklus hidup yang mirip dengan keempat spesies *Plasmodium* yang menginfeksi manusia. (Janse & Water, 2002)

Keberadaan *Plasmodium* di dalam tubuh akan merangsang sistem imun untuk memberikan perlindungan bagi tubuh dengan jalan menghilangkan benda asing atau antigen, di antaranya adalah dengan mengaktivasi sel T limfosit dan makrofag serta produksi TNF (*Tumor Necrotizing Factor*). Respon imun dalam rangka melawan keberadaan parasit yang melibatkan makrofag, limfosit-T, dan berbagai sel yang lain, akan disertai hasil samping metabolit aktif dan pembentukan *reactive oxygen species* atau terbentuk radikal bebas. Radikal bebas yang bersumber dari sel-sel fagosit saat fagositosis sel darah merah yang mengandung *Plasmodium* membantu dalam mengeliminasi penyebab penyakit malaria, tetapi radikal bebas yang terbentuk dapat juga melisiskan sel darah merah yang normal serta merusak sel endotel pada berbagai organ bila pembentukannya berlebihan. Dengan demikian perusakan oksidatif oleh radikal bebas menjadi salah satu mekanisme penyebab kelainan patologis pada malaria (Hunt *et al*, 1992).

Hepar merupakan salah satu organ yang menjadi sasaran pada infeksi malaria. Komplikasi malaria juga sering mengenai hepar. Selain merupakan tempat berkembangbiaknya *Plasmodium* pada siklus eksoeritrositik, kegagalan fungsi hepar juga sering ditemui pada malaria, antara lain ikterus dan *hepatomegaly*.

Sejak pertama kali ditemukan pada tahun 1930, *Chloroquine* telah terbukti efektif dalam membunuh *Plasmodium* terutama stadium *schizont*. *Chloroquine* juga efektif membunuh semua stadium *Plasmodium* di darah untuk semua spesies, kecuali *Plasmodium falciparum*, karena *Chloroquine* tidak dapat membunuh *gametocyte Plasmodium* (Manson, 1987)(Sukarban & Zunilda, 1995)(Harijanto, 2000). Menurut survey yang dilakukan oleh Depkes RI tahun 1990, *Chloroquine* masih sesuai digunakan sebagai obat antimalaria karena relatif murah dengan batas keamanan yang tinggi dan sedikit efek samping (Depkes RI, 1990)(Sukarban &

Zunilda,1995). Walaupun resistensi terhadap *Chloroquine* telah banyak dilaporkan di luar negeri (Collin, *et al.*,1997) tetapi di Indonesia obat ini masih merupakan obat pilihan utama lini pertama pada kasus malaria (Depkes RI, 1990).

Keterlibatan radikal bebas pada patogenesis terjadinya komplikasi malaria kini mulai menjadi pusat perhatian, sehingga banyak peneliti yang mencoba memakai antioksidan sebagai terapi tambahan pada kasus malaria (Treprasertsuk, *et al.*, 2003)(Fitri, 2004). Penggunaan antioksidan pada pengobatan malaria juga telah dicobakan pada binatang. Fitri, *et al.*, 2003 melaporkan bahwa terdapat penurunan derajat parasitemia dan peningkatan aktivitas makrofag pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi kombinasi *Chloroquine* dan asam askorbat. Banyak juga penelitian lain yang mulai menggunakan kombinasi antimalaria dengan antioksidan lain terutama asam askorbat, α -tocoferol , β - karoten serta berbagai antioksidan lain termasuk *N-Acetyl Cysteine* untuk mempercepat eliminasi *Plasmodium* (Hunt, *et al.*, 1992) (Halliwell & Gutteridge, 1998).

N-Acetyl Cysteine selama ini lebih dikenal sebagai *mucolytic agent* dan digunakan sebagai terapi tambahan pada kasus bronchitis kronis. *N-Acetyl Cysteine* disamping sebagai *mucolytic agent* juga diketahui sebagai antioksidan. Obat ini di dalam darah akan menjadi *cysteine* yang merupakan protein *sulfhydryl antioksidant groups*. Penggunaan NAC sebagai antioksidan telah banyak dilaporkan. Behr,1997; Vries,1998 menemukan penggunaan NAC dosis tinggi terbukti efektif dalam pengobatan penyakit paru termasuk kanker dan metastasenya. NAC dapat meningkatkan kadar *glutathione* intrasel sehingga bermanfaat dalam pengobatan AIDS dan kanker hati, seperti yang dilaporkan oleh Yim *et al.*, 1994 dan Kinscherf, 1994.

N-Acetyl Cysteine diduga mempunyai potensi sebagai obat anti malaria. NAC diduga berfungsi sebagai *cysteine proteinase inhibitor* yang dapat menstabilkan membran eritrosit sehingga menghambat keluarnya *Plasmodium* dari eritrosit. Walaupun potensinya sebagai antimalaria masih belum jelas, tetapi NAC sudah mulai dicobakan penggunaannya pada penyakit malaria dengan kombinasi bersama antimalaria lain. Pemberian NAC 140mg/kgBB dilanjutkan dengan 70 mg/kgBB selama 6 hari yang dikombinasi dengan artesunat pada penderita *malaria falciparum*, menunjukkan waktu penyembuhan yang lebih cepat daripada pengobatan dengan artesunat saja (Treeprasertsuk *et al* , 2003). Selain itu dilaporkan juga bahwa pada penderita malaria *falciparum* berat yang diberi NAC oral 300 mg/kgBB terdapat penurunan kadar serum laktat sebagai marker pada malaria berat, walaupun perbedaan tersebut tidak signifikan (Watt,2002). Sedangkan pemberian kombinasi *Chloroquine* dengan NAC pada malaria belum pernah dilaporkan selama ini.

Chloroquine selain sebagai antimalaria juga mempunyai efek anti-inflamasi karena *Chloroquine* dapat menghambat prostaglandin. Efek ini menyebabkan *Chloroquine* berpotensi sebagai antioksidan, walaupun pemakaiannya sebagai antioksidan belum banyak dilaporkan. Dengan kombinasi bersama NAC yang telah dikenal sebagai antioksidan yang poten, patut diduga kedua obat ini bekerja secara sinergis dalam menurunkan aktivitas radikal bebas pada malaria dan berefek sinergi dalam menghambat siklus hidup *Plasmodium*, menurunkan derajat parasitemia, sehingga mempercepat kesembuhan pada penderita malaria. Penelitian ini juga diperlukan untuk membuktikan apakah efek sinergis *Chloroquine* dan NAC melalui efeknya sebagai antioksidan ataukah melalui sinergi dalam peningkatan aktivitas sistem imun seluler ataukah melalui kedua jalur tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* memberi efek sinergi terhadap penurunan aktivitas radikal bebas hepar dan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit selama infeksi *Plasmodium berghei* ?

1.3 Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah sebagai berikut:

1. Kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* memberi efek sinergi terhadap aktivitas radikal bebas pada hepar pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*
2. Kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* memberi efek sinergi terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneal pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Siklus Hidup *Plasmodium*

a. Siklus hidup dalam tubuh manusia (aseksual/skizogoni)

Stadium Hati (Stadium Ekso-eritrositik)

Stadium ini dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina menggigit manusia dan memasukkan *sporozoite* yang terdapat pada air liurnya ke dalam darah manusia sewaktu menghisap darah. Dalam waktu beberapa menit *sporozoite* sudah tiba di hati dan mulai menginfeksi hati. *Sporozoite* mengalami produksi aseksual selama beberapa hari di dalam sel hati menjadi *schizont* dan menghasilkan 10.000 – 30.000 *merozoites* yang selanjutnya dikeluarkan dari sel hati dan menginfeksi eritrosit (Nugroho & Wagey, 2000).

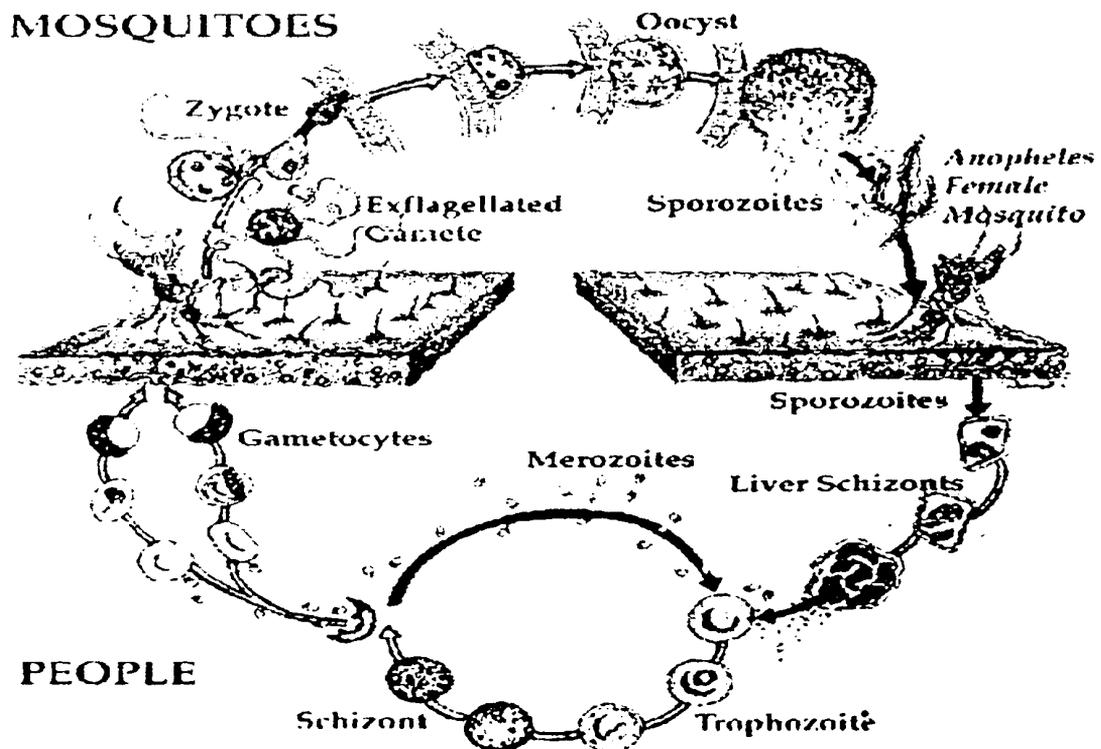
Stadium darah (Stadium Eritrositik)

Proses skizogoni eritrosistik dimulai pada waktu keluarnya *merozoite* dari sel hati dan masuk ke dalam sel darah merah. Di dalam eritrosit, *merozoite* berubah bentuk dan tumbuh membesar menjadi sel tunggal disebut *trophozoite*. *Trophozoite* mengalami perkembangan menjadi *schizont*. Beberapa kali pembelahan pada proses skizogoni akan menghasilkan beberapa *merozoite*. Setelah pembentukan *merozoite* selesai, eritrosit akan pecah dan melepaskan *merozoite* ke dalam plasma dan selanjutnya akan menyerang eritrosit lain dan memulai proses baru. Proses ini berlangsung terus menerus karena *merozoite* yang dilepaskan ke dalam darah terus menginfeksi eritrosit-eritrosit yang masih sehat (Nugroho & Wagey, 2000).

Beberapa *merozoite* atas dasar yang belum diketahui berdeferensiasi menjadi bentuk seksual parasit yaitu *gametocyte* dalam waktu beberapa hari tergantung spesiesnya. Ada 2 jenis *gametocyte* yaitu *macrogametocyte* (betina) dan *microgametocyte* (jantan). Selanjutnya *gametocyte* akan berkembang terutama pada malam hari, hal ini untuk menyesuaikan diri dengan kebiasaan nyamuk *Anopheles* yang menggigit pada malam hari. *Gametocyte* akan tertelan bersama darah yang dihisap nyamuk yang menggigit penderita, selanjutnya dimulai siklus sporogoni dalam tubuh nyamuk (Nugroho & Wagey, 2000).

b. Siklus hidup dalam tubuh nyamuk (seksual/sporogoni)

Gametocyte akan mengalami proses pematangan di dalam usus nyamuk untuk menjadi gamet (gametogenesis). *Macrogametocyte* segera menjadi makrogamet, sedangkan pembentukan mikrogamet mencapai puncaknya 25 menit setelah nyamuk menghisap darah. Dalam beberapa menit mikrogamet akan membuahi makrogamet, kedua inti sel bersatu/fusi untuk menghasilkan zigot diploid. Dalam 18-24 jam terbentuk ookinet matang yang motil dari masing-masing zigot. Ookinet matang bergerak menembus sel epitel usus hingga mencapai permukaan luar usus dan kemudian ookinet berada di lamina basalis yaitu lapisan matriks ekstraseluler yang memisahkan hemosel dari usus. Di lamina basalis ini selama beberapa hari ookinet mengalami pematangan menjadi ookist. Setelah beberapa kali mengalami mitosis ookist mengandung ± 10.000 *sporozoite* motil. Ookist akan pecah dan melepaskan *sporozoite* ke dalam sirkulasi nyamuk dan bergerak menuju kelenjar ludah nyamuk (Nugroho & Wagey, 2000).



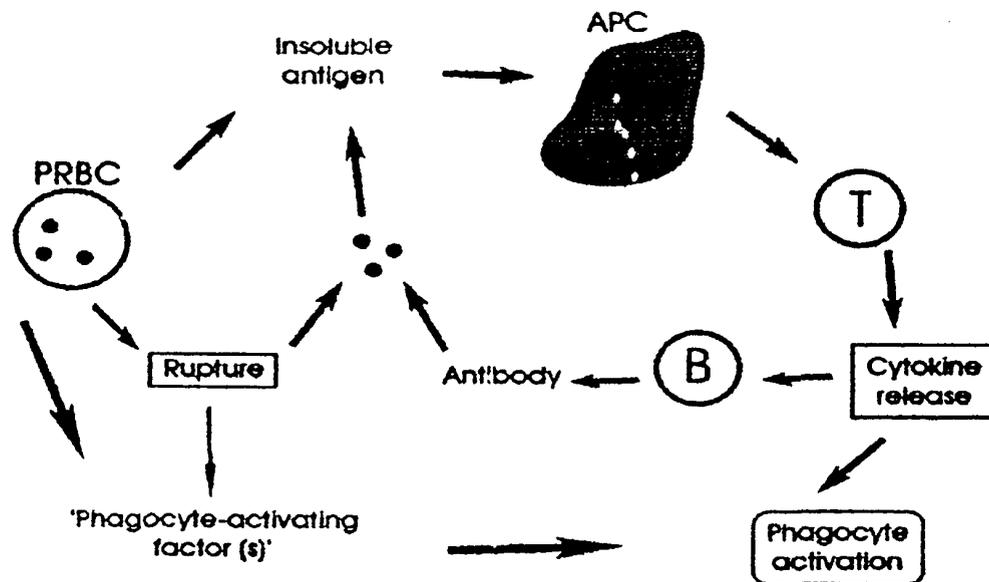
Gambar 2.1 Siklus Hidup *Plasmodium* (sumber : <http://www.elsevier.com/lifecycle/plasmodium/html>.)

2.2 Respon Imun terhadap Malaria (*Plasmodium*)

Respon imun terhadap infeksi malaria merupakan proses yang kompleks dan berbeda-beda tergantung spesies *Plasmodium* yang menyebabkannya, akan tetapi ada satu hal yang penting, bahwa aktivasi sel-sel fagosit menjadi peranan utama pada respon imun ini (Hunt *et al*, 1992).

Antigen dari parasit bisa berada di permukaan sel darah merah yang terinfeksi (*parasitized red blood cell* atau PRBC) atau bisa berasal dari *merozoite-merozoite* yang terlepas karena pecahnya PRBC setelah sebelumnya terjadi multiplikasi aseksual di dalam sel darah merah tersebut. Pengenalan antigen ini dilakukan oleh *antigen presenting cell* (APC) yang selanjutnya akan menginduksi aktivasi limfosit-T.

Limfosit-T yang teraktivasi akan melepaskan berbagai macam sitokin (*cytokines*), termasuk di antaranya *interleukin-4* (IL-4) yang berfungsi dalam pelepasan antibodi oleh limfosit-B (Gambar 2.2). Keberadaan antibodi akan membantu dalam proses fagositosis PRBC, *merozoite-merozoite* bebas atau debris. Sitokin yang lain seperti *interferon gamma* (IFN γ) bisa mengaktivasi sel-sel fagosit, terutama monosit atau makrofag (Hunt, *et al.*, 1992).



Gambar 2.2 Respon Imun terhadap malaria(Sumber : Hunt, *et al.*, 1992. *Free Radicals and Antioxidants in Malaria*)

2.2.1 Respon imun seluler pada infeksi malaria

Makrofag dan Proses Fagositosis

Makrofag merupakan sel fagosit yang paling penting. Makrofag diproduksi oleh sumsum tulang. Sel-sel makrofag dapat dijumpai di hepar sebagai sel Kupfer, di dalam paru sebagai makrofag alveolar, di glomerulus sebagai sel mesangial, di otak sebagai mikroglia dan lain-lain. Makrofag sangat berperan dalam sistem imun.

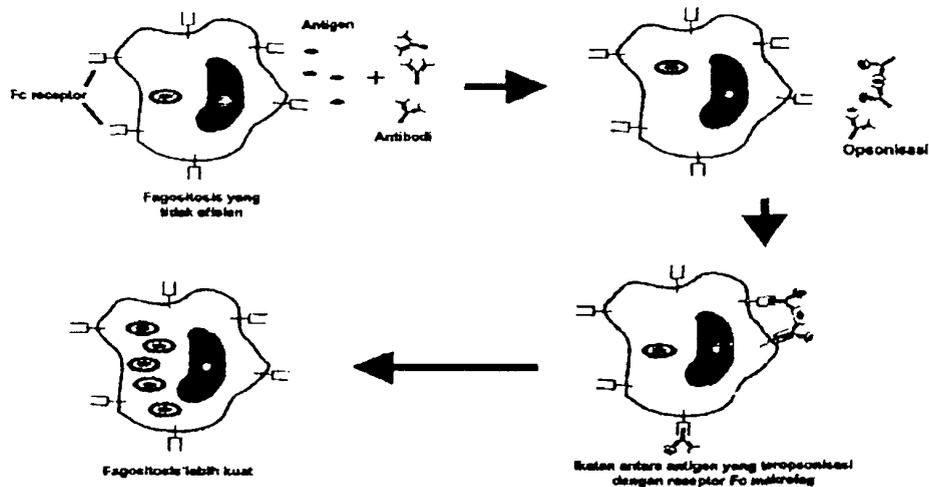
Sel ini merupakan sel efektor yang berperan dalam eliminasi benda asing termasuk mikroba dan parasit.

Beberapa fungsi makrofag antara lain :

- Merusak benda asing yang masuk, fungsi ini dilakukan oleh lisosom yang terdapat dalam makrofag. Lisosom ini mengandung enzim hidrolase dan peroksidase yang dapat merusak mikroorganisme.
- Makrofag mempunyai reseptor terhadap beberapa fraksi immunoglobulin yaitu IgG1, IgG3 dan IgE serta reseptor komplemen sehingga dapat menghancurkan antigen ekstraseluler.
- Makrofag merupakan sel penyaji (*Antigen Presenting Cells*) yang menyajikan antigen kepada sel T. Selain itu makrofag mampu mengekspresikan molekul MHC kelas II yang sangat berperan dalam respon imun.
- Makrofag mampu memproduksi sejumlah mediator. Beberapa reaksi autoimun dikatakan melibatkan mediator yang dikeluarkan oleh makrofag.
- Pada proses penghancuran mikroba oleh makrofag, juga diproduksi radikal bebas yang berperan dalam patogenesis beberapa penyakit termasuk malaria.

Proses fagositosis yang dilakukan oleh makrofag diawali dengan opsonisasi, yaitu proses perlekatan makrofag dengan opsonin, seperti immunoglobulin G atau fraksi komplemen, proses perlekatan ini akan mempercepat dan menambah efektivitas fagositosis. Opsonin merupakan makromolekul yang melekat pada permukaan mikroorganisme yang dapat dikenali oleh reseptor permukaan neutrofil atau makrofag.(Abbas,2000)(Roitt,2002). Selanjutnya makrofag akan bergerak

menuju sel target dengan cara kemotaksis. Proses ini dapat berlangsung karena makrofag mampu menghasilkan enzim proteolitik yang akan merintis lintas gerak makrofag. Selain itu terdapat beberapa bahan yang dihasilkan oleh jaringan yang radang maupun bahan yang dihasilkan oleh bakteri yang dapat bertindak sebagai bahan kemotaktik.



Gambar 2.3 Proses Opsonisasi dan Fagositosis

(Sumber : Abbas, *et al.*, 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th)

Pada penyakit malaria, baik respon imun seluler maupun humoral sama-sama berperan, walaupun peran utama dalam eliminasi parasit dilakukan oleh makrofag, tetapi dalam menjalankan fungsinya, makrofag tetap memerlukan immunoglobulin, terutama IgG dan komplemen C3 untuk mencerna *Plasmodium* tersebut.

2.3 Radikal Bebas pada Infeksi Malaria

Radikal bebas adalah oksidan, tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas. Oksidan adalah suatu senyawa yang dapat menerima electron (*electron acceptor*), sedangkan radikal bebas adalah atom atau gugus yang orbital luarnya

memiliki electron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini bersifat *magnetic* dan sangat reaktif, sehingga dapat merusak sel-sel tubuh dan menimbulkan kerusakan pada organ (Cochrane,1991).

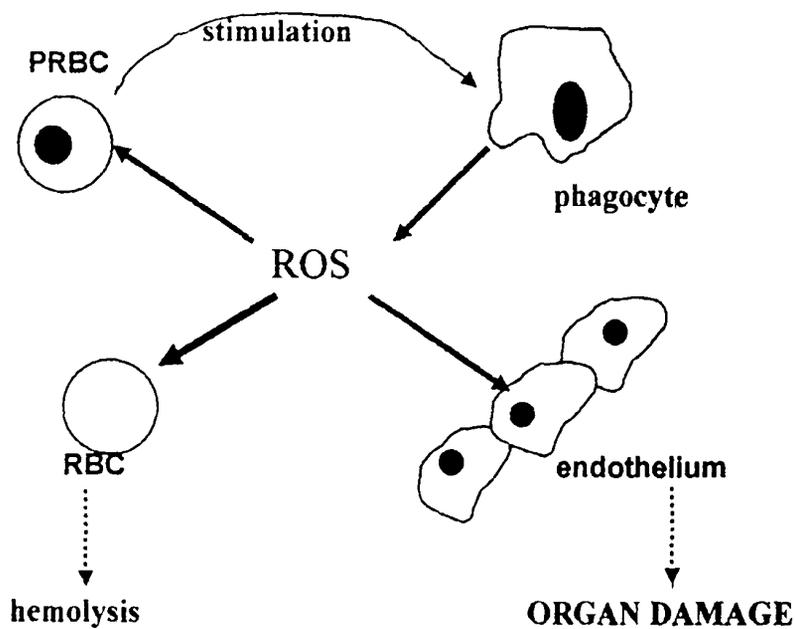
Sejumlah penelitian menunjukkan adanya peran radikal bebas terutama ROS (*Reactive Oxygen Species*) pada patogenesis malaria. ROS dihasilkan oleh makrofag dalam usahanya mengeluarkan *Plasmodium*. ROS yang dihasilkan tersebut akan dikeluarkan ke sirkulasi dan menimbulkan kerusakan organ (Hunt, *et.al.*,1992).

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 termasuk makrofag dan eritrosit yang normal sehingga dapat menurunkan aktivitas makrofag dan menimbulkan kerusakan organ.

Pada infeksi malaria, sel-sel fagosit yang teraktivasi yang mungkin berlokasi di mikrosirkulasi dari limpa, melepaskan sejumlah faktor 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). Penelitian baik secara *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan bahwa pada makrofag mencit yang diinfeksi beberapa species malaria dan kemudian diekspos dengan PRBC (*Parasitized Red Blood Cells*) menunjukkan kemampuan dalam memproduksi ROS (Stocker *et al*, 1984 *cit* Hunt, 1992). ROS yang dihasilkan ini berfungsi membunuh parasit intraeritrosit. Hal ini telah dibuktikan oleh Hunt & Stocker, 1990, yang menggunakan agen pembangkit ROS seperti H₂O₂, *alloxan*, *t-butyl hydroperoxide* dan *5-hydroxypirimidines* dan diberikan pada tikus yang telah

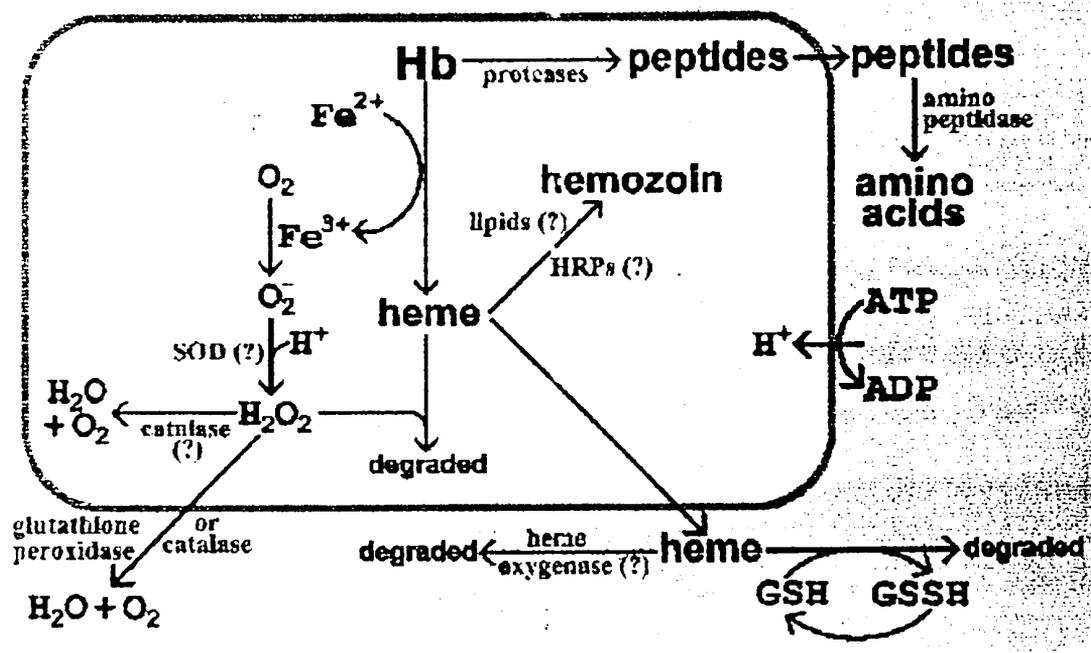
diinfeksi *P. vinckei*, *P. berghei* dan *P. yoelii*, menunjukkan kemampuannya dalam membunuh parasit intraeritrosit. Mereka juga menunjukkan bahwa dengan pemberian *iron chelators* atau *radical scavengers*, aktivitas antimalarianya menjadi berkurang.

ROS yang dihasilkan oleh makrofag selain berfungsi membunuh parasit, juga berpengaruh terhadap sel disekitarnya, termasuk eritrosit normal juga akan mengalami lisis. ROS tersebut juga akan merusak endotel organ sehingga menimbulkan kerusakan pada organ. Patogenesis malaria selain diakibatkan oleh ROS juga diakibatkan oleh *TNF* dan sitokin yang dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi. Dapat dikatakan bahwa ROS dibutuhkan untuk membunuh parasit, tetapi ia juga menimbulkan kerusakan organ sehingga dalam keadaan berlebihan justru merugikan, sehingga dalam hal ini penggunaan antioksidan sangat diperlukan.



Gambar 2.4 Peran ROS dalam Patologi Malaria (Hunt et al, 1992)

ROS selain dihasilkan oleh makrofag, juga dihasilkan oleh eritrosit yang terinfeksi parasit dalam proses degradasi hemoglobin. Heme bebas yang dihasilkan ini akan bereaksi dengan Fe dan radikal hidroksil yang dihasilkan oleh mitokondria sehingga terbentuk radikal oksigen dan oxidative stress (Oliveira, 2002). Atas dasar itulah saat ini banyak yang mulai mencobakan pemberian *iron chelator* seperti desferrioxamin dan antioksidan dalam pengobatan malaria untuk menghindari oxidative stress tersebut.



Gambar 2.5 Proses Degradasi Hemoglobin dan Stress Oksidatif pada Eritrosit yang Terinfeksi Parasit (<http://www1.elsevier.com/febs/520/19/21/gr1.gif>)

2.4 Chloroquine

Chloroquine termasuk dalam kelompok *blood schizonticide* yang bekerja pada stadium eritrositik. *Chloroquine* merupakan obat pilihan sejak dahulu kala yang cukup efektif *in vitro* maupun *in vivo*.

Ada beberapa mekanisme kerja *Chloroquine* dalam mengeliminasi keberadaan parasit. *Chloroquine* mempunyai kemampuan untuk menghalangi sintesa enzim pada parasit dalam pembentukan DNA dan RNA. Obat ini bersenyawa dengan DNA sehingga proses pembelahan dan pembentukan RNA terganggu. *Chloroquine* juga menimbulkan peningkatan pH di dalam vakuola makanan parasit yang sensitif terhadap *Chloroquine* yang secara normal bersifat asam. *Chloroquine* dapat menimbulkan perubahan pada pigmen *Plasmodium* yang dibutuhkan untuk mendetoksikasi heme, hasil pencernaan hemoglobin hospes. *Chloroquine* juga menghambat aktivitas enzim *heme polymerase* yang dibutuhkan untuk reaksi detoksikasi heme. Dengan demikian maka *Chloroquine* menyebabkan peningkatan kadar heme dalam tubuh *Plasmodium* sehingga bersifat toksik dan selanjutnya dapat membunuh *Plasmodium* (Tracy & Webster, 1996).

Kepekaan *Plasmodium* intraeritrosit terhadap *Chloroquine* berhubungan dengan kemampuannya untuk mengakumulasi *Chloroquine* di dalam eritrosit. Ada dugaan bahwa pigmen yang dilepaskan dari degradasi Hb bertindak sebagai reseptor untuk *Chloroquine* dan turunannya. Pigmen ini atau kompleksnya dengan *Chloroquine* dapat menyebabkan lisis parasit (Sukarpan & Zunilda, 1998). *Chloroquine* bekerja menghambat pemakaian heme eritrosit oleh *Plasmodium* di vacuola makanan sehingga didapatkan heme bebas yang tidak terpakai. Heme yang terbebas ini memicu reaksi pembentukan ROS. Bila ROS berlebihan justru dapat berbahaya karena merusak jaringan hospes. Dalam keadaan ini dibutuhkan antioksidan untuk melindungi kerusakan jaringan (patologis) yang lebih lanjut (Halliwell & Gutteridge, 1998).

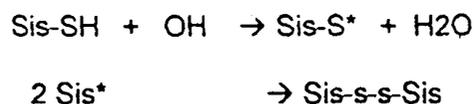
Chloroquine juga memperlihatkan efek antiradang. Efek ini dimanfaatkan dalam pengobatan *arthritis rheumatoid* dan *lupus entematosus discoid*. Obat ini

juga berguna untuk mengobati reaksi *photo-allergic* (Thomson, 2002). Selain itu *Chloroquine* juga dapat digunakan sebagai obat topical dalam pengobatan *cutaneous larva migrans* (Manson, 1988), suatu penyakit yang disebabkan invasi cacing *Ancylostoma caninum* dan *Ancylostoma braziliensis*.

2.5 N-ACETYL CYSTEINE

2.5.1 N-Acetyl Cysteine sebagai antioksidan

N-Acetyl Cysteine dapat berfungsi sebagai antioksidan karena dapat diubah menjadi *cysteine* yang merupakan *protein sulfhidril groups*. Adanya gugus sulfhidril ini yang mengakibatkan *cysteine* dapat menjadi donor elektron bagi oksidan, terutama radikal hidroksil.



Berdasarkan sifat tersebut, *cystein* dapat menjadi antioksidan dengan cara :

1. Antioksidan pencegah

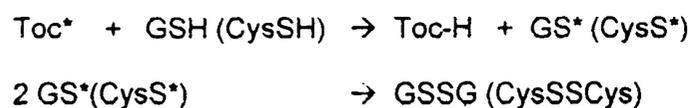
Cysteine dapat mencegah timbunan radikal hidroksil (OH^*) dengan mengkatalisimya menjadi H_2O . Radikal hidroksil merupakan radikal yang paling berbahaya. Senyawa ini merupakan radikal yang paling reaktif yang potensial mampu menyerang semua molekul biologi termasuk DNA.

(Tjokprawiro, 1993)

2. Antioksidan pemecah rantai

Cysteine bersifat hidrofilik dan berperan dalam sitosol dan cairan ekstrasel.

Cysteine dapat bereaksi dengan vitamin E yang terdapat dalam sitosol



3. *Cysteine* juga dapat meningkatkan kadar *glutathione perokside* pada sel, sehingga dapat meningkatkan kadar antioksidan yang lain. Dalam metabolismenya, *cysteine* yang dihasilkan akan memasuki jalur metabolisme *glutathione* dan meningkatkan kadar GSH (gambar 2.6)

Sebagai antioksidan yang larut dalam air, *cysteine* dapat ditemukan intra maupun ekstraseluler. *Cysteine* masuk ke dalam sel dengan cara melawan gradien konsentrasi bersamaan dengan pengambilan Na^+ (Halliwell & Gutteridge, 1998).

2.5.2 Peranan *N-Acetyl Cysteine* terhadap Fungsi Sistem Imun

N-Acetyl Cysteine dapat memperkuat resistensi tubuh terhadap berbagai macam penyakit, termasuk penyakit infeksi dan beberapa bentuk kanker. *N-Acetyl Cysteine* dapat memperkuat dan melindungi sistem imun melalui stimulasi aktivitas antibodi dan sel-sel sistem imun seperti fagosit dan netrofil. *N-Acetyl Cysteine* dapat meningkatkan aktivitas makrofag, sel-sel CD4^+ dan CD8^+ (Kinscherf, 1994).

Bukti bahwa *N-Acetyl Cysteine* mampu menstimulasi fagositosis ialah pemberian *N-Acetyl Cysteine* dengan dosis harian sebesar 600 mg pada penderita *Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)*, ternyata mampu meningkatkan aktivitas makrofag, mengembalikan fungsi sel fagositik yang sudah rusak dan kemampuan *intracelullar killing* (Vechiarelli, 1994).

Beloqui, 1993 menemukan bahwa *N-Acetyl Cysteine* dapat mempercepat waktu penyembuhan pada penderita hepatitis bila diberikan bersama interferon. Obat ini juga telah terbukti dapat meningkatkan imunitas pada penderita AIDS (Droge, 1993). Pada penderita AIDS, NAC terbukti meningkatkan kadar sel-sel CD4^+ dan sel CD8^+ , sehingga dapat meningkatkan imunitas pada penderita AIDS. (Kinscherf *et al.*, 1994) NAC juga terbukti efektif mencegah respon inflamasi pada penderita AIDS, hal ini berhubungan dengan pengaruh *cysteine* dalam

meningkatkan kadar *glutathione*. Pada penderita AIDS, kadar *glutathione* yang rendah menyebabkan penderita AIDS sangat rentan terhadap infeksi. Apabila kadar *glutathione* meningkat, respon inflamasi dicegah dan hal ini sangat menguntungkan penderita AIDS (Roedeerer, 1994)(Droge, 1993).

2.5.3 *N-Acetyl Cysteine* dan Malaria

Penggunaan *N-Acetyl Cysteine* pada penyakit malaria belum banyak dilaporkan. Treeprasertsuk *et al*, 2003 melaporkan bahwa pemberian NAC dengan dosis 140 mg/kg per hari yang diikuti dengan dosis 70 mg/kg setiap 4 jam sampai tercapai 12 dosis, dapat menurunkan gejala dan mempercepat waktu kesembuhan pada penderita malaria *falciparum* berat.

N-Acetyl Cysteine yang kemudian dalam darah akan diubah menjadi *cysteine* dapat menimbulkan efek antiplasmodium karena zat ini dapat menghambat enzim *cysteine protease* yang dibutuhkan oleh *Plasmodium* untuk memecah eritrosit dan menginvasi eritrosit yang lain. *N- Acetyl Cysteine* yang merupakan precursor *glutathione* akan membantu menjaga kestabilan membran eritrosit sehingga eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* tidak mudah pecah dan merozoit yang keluar pun tidak mudah menginfeksi eritrosit yang lain. Walaupun penggunaannya sebagai antimalaria belum banyak dilaporkan, tetapi penggunaan *cystein* yang dikombinasikan dengan asam amino lain untuk pengobatan penyakit parasit sudah mulai dilakukan, seperti penggunaannya untuk mengobati penyakit akibat *Trypanosoma cruzi* dan *Trypanosoma gambiense* di Afrika (Juan *et al*, 1998)

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan

3.1.1 Tujuan Umum

Mengetahui adanya efek sinergi pemberian *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* terhadap aktivitas radikal bebas hepar dan aktivitas fagositosis makrofag selama infeksi *Plasmodium berghei*.

3.1.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui adanya efek sinergi *Chloroquine* dan *N- Acetyl Cysteine* terhadap penurunan aktivitas radikal bebas hepar selama infeksi *Plasmodium berghei*.
- b. Mengetahui adanya efek sinergi *Chloroquine* dan *N- Acetyl Cysteine* terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal selama infeksi *Plasmodium berghei*

3.2 Manfaat

1. Pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi :
 - Mendukung teori peran radikal bebas pada patogenesis malaria.
 - Menambah dan mendukung teori pengembangan protease inhibitor pada pengobatan malaria
 - Memberi tambahan pengetahuan tentang efek *N-Acetyl Cysteine* sebagai imunomodulator.
2. *N-Acetyl Cysteine* dapat digunakan sebagai terapi tambahan yang diberikan bersama *Chloroquine* pada pengobatan penyakit malaria

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain *post test control group design* (pengambilan data dilakukan setelah perlakuan). Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok. Pembagian kelompok diadaptasi dari Dolezal & Krisiak, 2001 dan Sukarban & Zunilda, 1995.

4.2 Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit berjenis kelamin jantan galur BALB/c yang berumur 6-8 minggu dengan berat berkisar 20-40 gram. Hewan coba diperoleh dari Fakultas MIPA Universitas Airlangga Surabaya.

Untuk perlakuan malaria digunakan *Plasmodium berghei* yaitu salah satu model malaria pada mencit (Janse & Waters, 2002). Parasit diambil dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjahmada Yogyakarta.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari - April 2005 di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Instrumen Penelitian

4.4.1 Inokulasi *Plasmodium berghei*

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

Alat : tabung *efendorf*, tabung *falcon* 15 ml , gunting steril, mikroskop, spuit insulin 1 ml, gelas benda, cat giemsa

4.4.2 Pemberian *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine*

Bahan : Aquadest, *Chloroquine* pro analisa (sigma) dan NAC pro analisa (sigma)

Alat : Gelas ukur, timbangan untuk obat

4.4.3 Pengukuran Parasitemia

Bahan : kapas alkohol, methanol PA, pulas giemsa, buffer giemsa, minyak imersi

Alat : gelas benda, gunting, pipet, tabung gelas ukur, mikroskop

4.4.4 Pengukuran kadar *Malondyaldehyde*

Bahan : homogenate hepar, Larutan 0,9% NaCl, TCA, HCl 1N, mikrohematokrit tube, tabung reaksi, Na-Thio, H₂O, saringan glass wool

Alat : spuit insulin, termos es, timbangan Mettler H31AR, mortar, muslim cloth, sentrifuge, tabung reaksi, kuvet, spektrofotometer

4.4.5 Pengukuran kadar *Glutathione (GSH)*

Bahan : homogenate hepar, Asam Sulfosalisilat 5%, Sodium Phosphat Buffer (0,1mM pH 7,4), DTNB (*5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*)

Alat : spuit insulin, termos es, timbangan Mettler H31AR, mortar, sentrifuge, spektrofotometer, tabung reaksi, kuvet

4.4.6 Pengukuran aktivitas fagositosis makrofag peritoneal

Bahan : bahan untuk kultur makrofag, yaitu *Washing medium* dan *Growth medium*, bahan untuk uji fagositosis, yaitu RPMI (*washing medium*), *latex beads* diameter 3 μm , PBS, Pulas Giemsa, Metanol Absolut dan aquadest.

Alat : tabung sentrifuge steril, sentrifuge dingin, microplate 24 (Nunc), *coverslip* bulat diameter berukuran 13 mm, incubator CO₂, pipet Pasteur steril, *micropipet* dan *tip* steril, *laminar flow hood*, kamar hitung (hemositometer) *Improve Neubauer* dan mikroskop

4.5 Definisi Operasional

a. Sinergi

Interaksi antara dua atau lebih obat sehingga terjadi penambahan efek, adanya sinergis efek dapat menurunkan dosis masing-masing obat dan menurunkan efek samping tanpa mengurangi khasiat obat tersebut (Health Forum, 2004)

b. Derajat Parasitemia

Jumlah parasit bentuk aseksual dalam darah tepi dalam 1000 eritrosit, dikalikan 100% (Harjanto, 2000)

c. Aktivitas radikal bebas

Aktivitas radikal bebas yang diukur adalah kadar *malondialdehyde* (MDA) yang merupakan hasil metabolisme oksidan/radikal bebas dan *glutathione* (GSH) sebagai antioksidan

d. Aktivitas Fagositosis

Aktivitas fagositosis adalah jumlah makrofag peritoneal yang memfagositosis/ memakan partikel latex dalam 200 sel makrofag (Supargiyono, 1990).

Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok besar, kelompok III dan IV masing-masing dibagi menjadi 3 subkelompok. Masing-masing kelompok dan subkelompok terdiri dari 9 ekor mencit yang dipilih secara acak.

- I. Kelompok kontrol (n=9), diinfeksi *Plasmodium berghei*, tanpa diberi *Chloroquine* atau NAC.
- II. Kelompok *Chloroquine* (n=9), diinfeksi *Plasmodium berghei*, dan diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB
- III. Kelompok NAC, diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi NAC; dibagi dalam 3 sub kelompok :
 - IIIA. NAC dosis 0,25 mg/gBB (n=9).
 - IIIB. NAC dosis 0,5 mg/gBB (n=9)
 - IIIC. NAC dosis 1 mg/gBB (n=9)
- IV. Kelompok *Chloroquine* + NAC, diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi kombinasi *Chloroquine* dan NAC, dibagi dalam 3 subkelompok :
 - IVA. *Chloroquine* 0,05 mg/gBB + NAC 0,25 mg/gBB (n=9)
 - IVB. *Chloroquine* 0,05 mg/gBB + NAC 0,5 mg/gBB (n=9)
 - IVC. *Chloroquine* 0,05 mg/gBB + NAC 1 mg/gBB (n=9)

Pertama-tama semua kelompok diinfeksi *Plasmodium berghei* intra peritoneal dengan konsentrasi 10^7 parasit per ekor yang berasal dari mencit yang telah terinfeksi *P.berghei* yang merupakan pasase kedua. Setelah tercapai parasitemia 10-20%, kelompok II diberi *Chloroquine* dengan dosis 0,05 mg/gBB mencit, kelompok III diberi *N-Acetyl Cysteine* dengan dosis yang bertahap; sedangkan kelompok IV diberi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* dosis bertahap. Pemberian

obat dilakukan satu kali sehari secara oral (sonde) selama 7 hari (Enggarfitri, 2001)(Simkeviciene *et al*, 2002) Pada hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-7 setelah pemberian obat, diambil masing-masing 3 ekor mencit untuk dimatikan dan dilakukan pemeriksaan parasitemia, MDA, GSH dan pemeriksaan aktivitas makrofag.

4.6.1 Inokulasi *Plasmodium berghei*

Inokulasi dilakukan secara *intra peritoneal* (i.p) sebanyak 10^7 parasit dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit. Jumlah eritrosit per ml darah dan parasitemia mencit donor yang akan ditransfer parasitnya terlebih dahulu dihitung. Untuk menghitung jumlah eritrosit, darah diambil dari ujung ekor sebanyak $10 \mu\text{l}$ dan dilakukan pengenceran $10^3 \times$ dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung *eri Naubauer*.

Parasitemia dihitung dari sediaan darah tipis yang telah dipulas dengan pewarnaan Giemsa. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop dengan pembesaran 1000x.

Dengan mengalikan jumlah eritrosit/ml darah dengan parasitemia, didapatkan jumlah parasit/ml darah. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan larutan M+ untuk mendapatkan konsentrasi parasit 10^7 dalam 0,2 ml darah, kemudian larutan tersebut ditransfer secara i.p ke mencit perlakuan sebanyak 0,2 ml. (lihat lampiran)

4.6.2 Pemberian *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine*

Chloroquine diberikan dengan dosis 0,05 mg/gr BB mencit per oral dengan cara diminumkan menggunakan sonde atau secara intraperitoneal dengan dosis $800 \mu\text{g}$ selama 5 hari (Suwami *et al*, 1994). Berdasarkan hasil eksplorasi yang dilakukan, cara pemberian *Chloroquine* dengan menggunakan sonde tidak jauh berbeda dibandingkan dengan pemberian *Chloroquine* secara intraperitoneal dalam

menurunkan derajat parasitemia. Dengan demikian dalam penelitian ini pemberian *Chloroquine* diberikan secara oral dengan dosis 0,05 mg/g BB mencit selama 7 hari. Mula-mula dihitung dulu jumlah obat untuk semua mencit, misal 100mg/hari. Kemudian ditentukan jumlah larutan yang dibutuhkan, misalnya 5 ml. Maka jumlah obat dalam larutan yang diberikan adalah dosis obat dibagi 100 mg, kemudian dikalikan 5ml.

N-Acetyl Cysteine diberikan dengan dosis 0,25 mg; 0,5mg dan dosis 1 mg/gram berat badan mencit per hari per oral,.. *N-Acetyl Cysteine* diberikan dengan cara melarutkannya dalam aquades dan kemudian diminumkan melalui sonde. Penghitungannya dilakukan dengan cara yang sama dengan *Chloroquine*.

4.6.3 Pengukuran Kadar MDA Hepar

Pengukuran kadar MDA ditentukan dengan reaksi perubahan warna dengan *Thiobarbituric acid* (TBA) menurut Uchiyama & Mihara, 1978. Prinsip dari metode ini adalah pengaruh asam dan panas akan menyebabkan dekomposisi lipid peroksida dan pembentukan MDA. MDA yang terbentuk ini direaksikan dengan TBA sehingga terbentuk perubahan warna yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 531 nm (Flower, 1973).

4.6.4 Pengukuran kadar GSH Hepar

Kadar GSH hepar diukur menurut metode Jollow, 1974; dengan cara homogenat hepar yang telah mengandung sel-sel hepar dicampur dengan asam sulfosalisilat 5% untuk melisis protein sel lain selain glutathion. Kadar GSH diukur berdasarkan perubahan warna yang terjadi setelah direaksikan dengan DTNB dan diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 412nm.

4.6.5 Pengukuran Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal

Makrofag diambil dengan cara lavase peritoneal dan dikultur menurut Lewis, 1985. Setelah kultur selama 24 jam, dilakukan uji fagositosis makrofag peritoneal non spesifik dilakukan *in vitro* menurut Supargiyono (1993) dengan menggunakan *latex beads* diameter 3 μm . Cara penghitungan fagositosis yaitu dalam 200 makrofag dihitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex dan berapa yang tidak memfagositosis partikel latex

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dicari rata-rata dan standard deviasinya, kemudian dilakukan uji beda antara kelompok kontrol, kelompok *Chloroquine*, kelompok NAC dan kelompok *Chloroquine*-NAC dengan analisis *multivarians (MANOVA)*. Perbedaan rerata per hari pada masing-masing kelompok dilakukan uji *Tukey HSD* dengan tingkat kepercayaan 0,05.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data

5.1.1 Hasil Pemeriksaan Aktivitas Radikal Bebas

Tabel 5.1 Rata-rata kadar MDA pada kelompok kontrol (I), kelompok *Chloroquine*(II), kelompok NAC(III), yang terdiri dari 3 sub kelompok (A,B,C) dan kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC(IV) yang terdiri dari 3 subkelompok (A,B,C)

Kelompok	Hari	Konsentrasi ($\mu\text{M}/\text{gr}$)
I	3	1.1013 \pm 0.2642
	5	0.9294 \pm 0.1765
	7	0.8344 \pm 0.0377
II	3	0.6638 \pm 0.1468
	5	0.7002 \pm 0.1331
	7	0.5590 \pm 0.0169
IIIA	3	0.6681 \pm 0.1729
	5	0.8400 \pm 0.2852
	7	0.5479 \pm 0.0238*
IIIB	3	0.8134 \pm 0.2690
	5	0.6331 \pm 0.0384
	7	0.7631 \pm 0.1209
IIIC	3	0.9867 \pm 0.1616
	5	0.7869 \pm 0.0024
	7	0.7953 \pm 0.1563
IVA	3	0.6345 \pm 0.0840
	5	0.6471 \pm 0.1712
	7	0.6135 \pm 0.0755
IVB	3	0.6653 \pm 0.0809
	5	0.6890 \pm 0.1586
	7	0.5870 \pm 0.1181
IVC	3	0.5507 \pm 0.0991
	5	0.6485 \pm 0.1204
	7	0.4976 \pm 0.0452

Keterangan :

- I. Kelp. Kontrol : diinfeksi *Plasmodium berghei*
- II. Kelp. *Chloroquine* : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB
- III. A Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 0,25 mg/gBB
- III. B Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 0,5 mg/gBB
- III. C Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 1 mg/gBB
- IV. A Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 0,25 mg/gBB
- IV. B Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 0,5 mg/gBB
- IV. C Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 1 mg/gBB

Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang memberikan perbedaan kadar MDA yang signifikan pada masing-masing hari dilakukan uji Tukey HSD dengan ringkasan hasil sebagai berikut:

- Pada hari ke-3 : terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok IVC ($p=0,015$)
- Pada hari ke-5 : tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan
- Pada hari ke-7 : terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok IVB ($p=0,04$) dan kelompok IVC ($p=0,003$)

Untuk mengetahui peningkatan ataupun penurunan aktivitas radikal bebas, maka hasil MDA harus dibandingkan dengan kadar GSH, dengan asumsi bahwa penurunan MDA akan diimbangi dengan meningkatnya GSH ataupun kadar GSH yang tetap. Hasil pemeriksaan kadar GSH disajikan pada tabel berikut.

Tabel 5.2 Rata-rata kadar GSH pada kelompok kontrol (I), kelompok *Chloroquine*(II), kelompok NAC(III), yang terdiri dari 3 sub kelompok (A,B,C) dan kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC(IV) yang terdiri dari 3 subkelompok (A,B,C)

Kelompok	Hari	Konsentrasi ($\mu\text{M}/\text{gr}$)
K1	3	0.3131 \pm 0.0003
	5	0.3131 \pm 0.0003
	7	0.3131 \pm 0.0003
K2	3	1.1013 \pm 0.2642
	5	0.9294 \pm 0.1765
	7	0.8344 \pm 0.0377
K3	3	0.6638 \pm 0.1468
	5	0.7002 \pm 0.1331
	7	0.5590 \pm 0.0169
K4	3	0.6681 \pm 0.1729
	5	0.8400 \pm 0.2852
	7	0.5479 \pm 0.0238
K5	3	0.8134 \pm 0.2690
	5	0.6331 \pm 0.0384
	7	0.7631 \pm 0.1209
K6	3	0.9867 \pm 0.1616
	5	0.7869 \pm 0.0024
	7	0.7953 \pm 0.1563
K7	3	0.6345 \pm 0.0840
	5	0.6471 \pm 0.1712
	7	0.6135 \pm 0.0755
K8	3	0.6653 \pm 0.0809
	5	0.6890 \pm 0.1586
	7	0.5870 \pm 0.1181
K9	3	0.5507 \pm 0.0991
	5	0.6485 \pm 0.1204
	7	0.4976 \pm 0.0452

Keterangan :

I. Kelp. Kontrol : diinfeksi *Plasmodium berghei*

II. Kelp. *Chloroquine* : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB

III. A Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 0,25 mg/gBB

III. B Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 0,5 mg/gBB

III. C Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 1 mg/gBB

IV. A Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 0,25 mg/gBB

IV. B Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 0,5 mg/gBB

IV. C Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 1 mg/gBB

Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang memberikan perbedaan kadar GSH yang signifikan pada masing-masing hari dilakukan uji Tukey HSD dengan ringkasan hasil sebagai berikut:

- Pada hari ke-3 : terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok IIIA ($p=0,028$), kelompok IIIB($p=0,00$); kelompok kontrol dgn kelompok IVB ($p=0,00$), dan kelompok kontrol dengan kelompok IVC($p=0,00$)
- Pada hari ke-5 : terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok IIIa,IIIB, IIIC, IVA, IVB dan IVC dengan nilai signifikansi $p=0,00$
- Pada hari ke-7 : terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok IIIA ($p=0,006$), dgn kip IIIB($p=0,00$), dgn kip IIIC($p=0,001$), dgn kip IVB ($p=0,00$) dan antara kelompok control dengan kelompok IVC($p=0,00$)

Berdasarkan kedua table diatas (table 5.1 dan table 5.2) dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol terjadi penurunan kadar MDA seiring dengan bertambahnya hari, walaupun secara statistic penurunan tersebut tidak bermakna ($p=0,298$ dan $p= 0,552$).. Pada kelompok kontrol, kadar GSH mula-mula menurun secara signifikan ($p=0,00$), tapi kadar GSH kemudian meningkat secara signifikan pada hari ke-7($p=0,00$).

Pada kelompok klorokuin, tidak terdapat penurunan maupun peningkatan kadar MDA yang signifikan. Sedangkan kadar GSH justru menurun secara signifikan pada hari ke-5 ($p=0,01$) tapi tidak meningkat secara signifikan pada hari ke-7($p=0,051$). Sehingga dapat dikatakan bahwa klorokuin tidak dapat meningkatkan

kadar GSH hepar. Hal ini terlihat dari tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok klorokuin.

Pada kelompok yang diberi NAC, pada dosis 0,25 mg/gBB ternyata tidak didapatkan penurunan MDA yang signifikan. Demikian juga pada dosis NAC 0,5 mg maupun NAC 1mg/gBB. Tetapi pada kelompok ini terjadi peningkatan kadar GSH yang signifikan yaitu pada dosis NAC 0,5 dan NAC 1 mg/gBB. Hal ini menunjukkan bahwa NAC merupakan senyawa yang dapat meningkatkan kadar GSH hepar pada dosis 0,5 dan 1 mg/gBB.

Pada kelompok yang diberi kombinasi klorokuin dan NAC, pada dosis 0,25 mg/gBB ternyata tidak didapatkan penurunan MDA yang signifikan. Penurunan MDA secara signifikan tercapai pada kombinasi klorokuin dan NAC 0,5 dan NAC 1 mg. Hal ini diikuti oleh adanya peningkatan kadar GSH yang signifikan pada kedua kelompok kombinasi tersebut. Secara umum dapat dikatakan bahwa pemberian kombinasi klorokuin dan NAC memberi efek yang lebih baik dalam menurunkan aktivitas radikal bebas hepar bila dibandingkan dengan pemberian klorokuin saja.

5.1.2 Hasil Pemeriksaan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal

Hasil penghitungan aktivitas fagositosis makrofag diperoleh dari jumlah makrofag yang memakan partikel latex tiap 200 makrofag. Hasilnya dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.3 Jumlah rata-rata makrofag yang memakan partikel latex pada kelompok kontrol (I), kelompok *Chloroquine* (II), kelompok NAC (III) dan kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC (IV)

Perlakuan	makrofag (jumlah) hari ke- ($\bar{X} \pm 1$ SD)			Analisis
	3	5	7	
I	75,00 \pm 8,54	85,67 \pm 10,69	90,00 \pm 14,93	Hasil Tukey : perbedaan makrofag signifikan pada hari ke-7 antara kelp. I dg IIIC ($p=0,038$); antara kelp. I dg. IVA,B,C ($p=0,014$; $p=0,008$; $p=0,003$) Perbedaan sign. Antara kelp. I dg. II ($p=0,03$)
II	66,57 \pm 16,92	76,33 \pm 23,18	60,00 \pm 3,00	
III.A	63,00 \pm 7,00	70,33 \pm 5,69	86,67 \pm 10,26	
III.B	71,33 \pm 7,64	80,33 \pm 4,73	97,67 \pm 2,52	
III.C	83,67 \pm 6,03	93,33 \pm 5,69	99,67 \pm 5,51	
IV.A	80,00 \pm 11,24	106,33 \pm 7,09	107,67 \pm 11,24	
IV.B	83,33 \pm 18,25	108,33 \pm 4,16	124,00 \pm 18,25	
IV.C	83,57 \pm 5,13	113,67 \pm 5,13	120,00 \pm 5,13	

Keterangan :

I. Kelp. Kontrol : diinfeksi *Plasmodium berghei*

II. Kelp. *Chloroquine* : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB

III. A Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 0,25 mg/gBB

III. B Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 0,5 mg/gBB

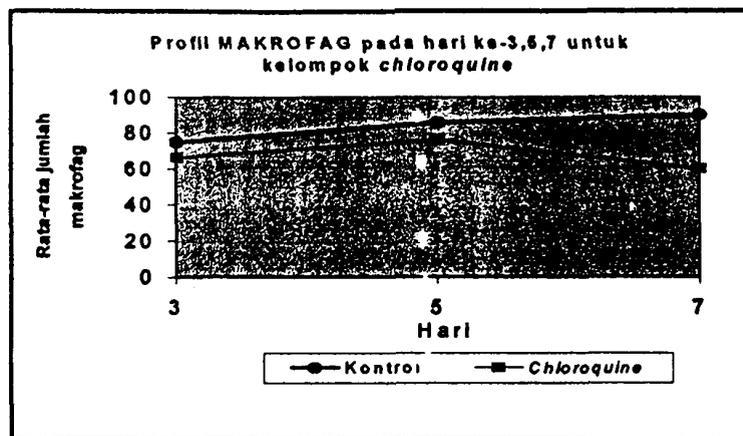
III. C Kelp. NAC : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi NAC 1 mg/gBB

IV. A Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 0,25 mg/gBB

IV. B Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 0,5 mg/gBB

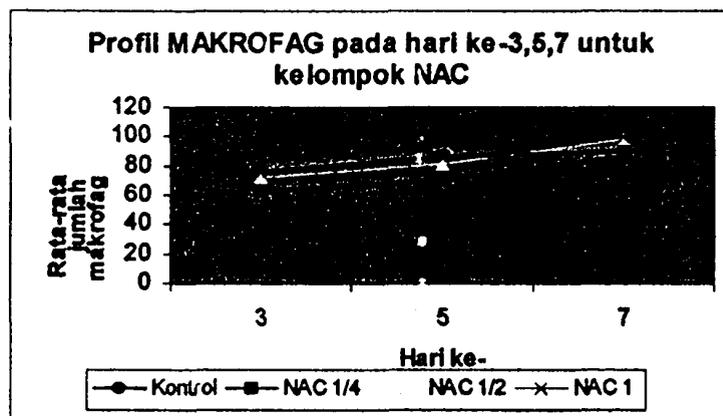
IV. C Kelp. Kombinasi : diinfeksi *Plasmodium berghei*, diberi *Chloroquine* 0,05 mg/gBB NAC 1 mg/gBB

Dari tabel 5.3 dapat dilihat bahwa pada semua kelompok perlakuan jumlah makrofag yang aktif memfagositosis partikel latex semakin meningkat, kecuali pada kelompok *Chloroquine*. Jumlah rata-rata makrofag relatif sama pada hari ke-3 antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan menunjukkan peningkatan pada hari ke-5 dan ke-7 (kecuali pada kelompok *Chloroquine*). Profil jumlah makrofag yang memfagositosis latex untuk masing-masing kelompok dapat dilihat pada grafik berikut.



Grafik 5.1 Grafik perbandingan jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan kelompok *Chloroquine*.

Pada kelompok *Chloroquine* jumlah makrofag yang memfagositosis latex mengalami penurunan dengan bertambahnya hari. Penurunan semakin tajam pada hari ke-7.



Grafik 5.2 Grafik perbandingan jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan kelompok NAC

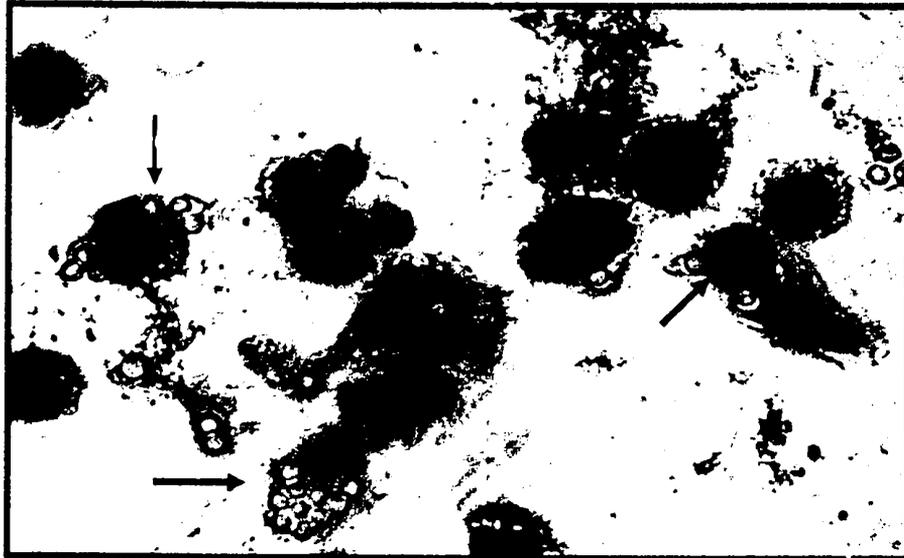
Pada kelompok NAC, jumlah makrofag yang memfagositosis latex meningkat pada kelompok NAC dosis 1mg/gBB, sedangkan pada kelompok NAC 0,25 dan NAC 0,5 jumlah makrofag relatif sama dengan kelompok kontrol (pada hari ke-3 dan

ke-5). Sedangkan pada hari ke-7, dosis NAC 0,5 dan NAC 1 mg/gBB meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag bila dibandingkan dengan kontrol.

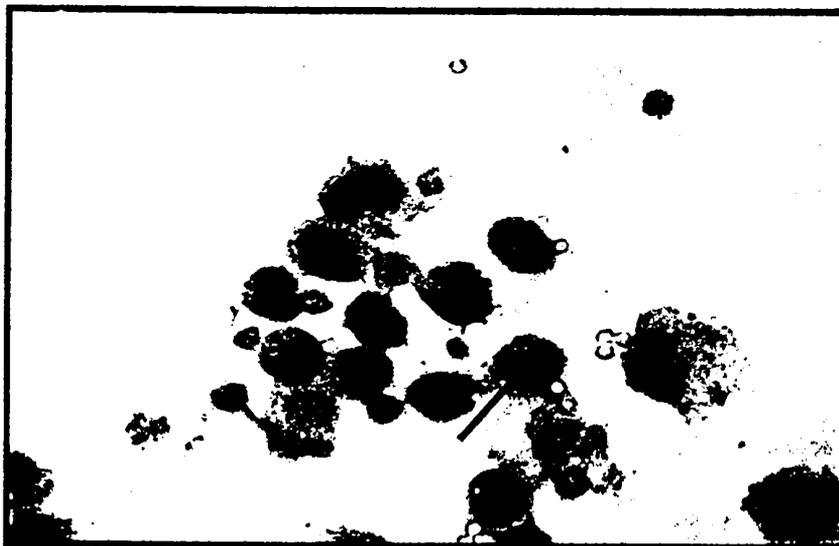


Grafik 5.3 Grafik perbandingan jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan kelompok *Chloroquine* + NAC

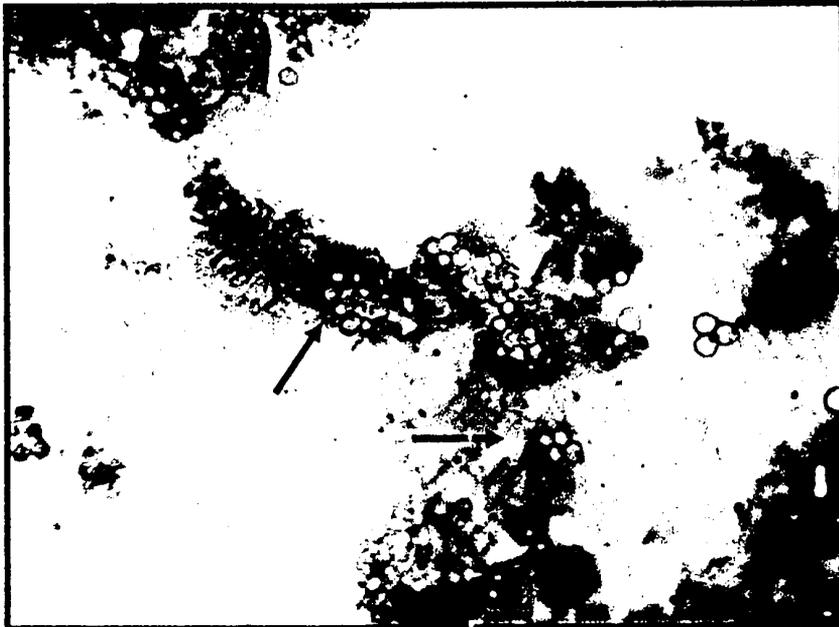
Pada grafik 5.3 dapat dilihat bahwa pada kelompok kombinasi *Chloroquine* dan NAC jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex meningkat dan peningkatan tersebut semakin tinggi pada hari ke-7. Kelompok kombinasi *Chloroquine* dan NAC 0,5mg/gBB menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kombinasi *Chloroquine* dan NAC 0,25 dan kombinasi *Chloroquine* dan NAC 0,5mg/gBB.



Gambar 5.1 Sel makrofag pada mencit galur BALB/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Tampak sel makrofag yang aktif yang memakan partikel latex (tanda panah). Pembesaran 1000x dengan pengecatan Giemsa.



Gambar 5.2 Sel makrofag pada mencit galur BALB/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi *Chloroquine*. Tampak sel makrofag yang aktif yang memakan partikel latex (tanda panah). Pembesaran 1000x dengan pengecatan Giemsa



Gambar 5.3 Sel makrofag pada mencit galur BALB/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi kombinasi *Chloroquine* dan NAC 0,5 mg/gBB. Tampak sel makrofag yang aktif yang memakan partikel latex (tanda panah). Pembesaran 1000x dengan pengecatan Giemsa

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara perlakuan (8 perlakuan : kontrol, *Chloroquine*, NAC 0.25, NAC 0.5, NAC 1, *Chloroquine*+NAC 0.25, *Chloroquine*+NAC 0.5 dan *Chloroquine* + NAC 1) terhadap aktivitas makrofag pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 secara bersama-sama, digunakan MANOVA (Multivariate Analysis of Variance), dengan hasil yaitu terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara perlakuan yang diberikan terhadap jumlah makrofag pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7 secara bersama-sama, dengan p value = 0.000.

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara perlakuan terhadap jumlah makrofag pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7 secara sendiri-sendiri dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 5.4 Hasil Analisis Data (ANOVA) untuk variabel jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan

Perlakuan	Sig.
Makrofag hari ke-3	0,125
Makrofag hari ke-5	0,008
Makrofag hari ke-7	0,000

Dari tabel 5.4 dapat dilihat bahwa tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara perlakuan terhadap jumlah makrofag pada hari ke-3 dengan p value=0,125. Sedangkan pada hari ke-5 dan hari ke-7, terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara perlakuan terhadap jumlah makrofag.

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata antar perlakuan terhadap jumlah makrofag pada masing-masing hari, digunakan Uji Perbandingan berganda Tukey sebagaimana terlihat pada tabel berikut.

Tabel 5.5 Hasil Uji Perbandingan berganda Tukey untuk variabel jumlah makrofag

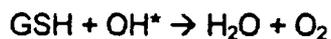
Kelompok	Sig.
Makrofag hari ke-3 :	
Kontrol -- <i>Chloroquine</i> (C)	0,981
-- NAC 0,25	0,743
-- NAC 0,5	0,999
-- NAC 1	0,976
-- CN 0,25	0,997
-- CN 0,5	0,981
-- CN 1	0,963
Makrofag hari ke-5 :	
Kontrol -- <i>Chloroquine</i>	0,982
-- NAC 0,25	0,808
-- NAC 0,5	0,999
-- NAC 1	0,994
-- CN 0,25	0,515
-- CN 0,5	0,392
-- CN 1	0,460

Ket : CN = *Chloroquine* + NAC

5.2 Pembahasan

5.2.1 Efek Pemberian kombinasi Klorokuin dan N-Acetyl Cysteine terhadap Aktivitas Radikal Bebas Hepar

Aktivitas radikal bebas dalam penelitian ini dilihat berdasarkan rata-rata kadar *malondialdehyde*(MDA) yang dibandingkan dengan kadar *glutathione*(GSH) dengan asumsi bahwa GSH sebagai antioksidan akan mengikat hasil metabolisme/ikatan MDA dengan superoksid dismutase, yaitu *hydrogen perokside*(H₂O₂) atau dengan reaksi sebagai berikut :



Kadar MDA dan kadar GSH menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan bila diuji secara bersama-sama, dengan nilai $p=0,000$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakuan, baik *Chloroquine*, NAC maupun kombinasi *Chloroquine* + NAC memberi pengaruh yang signifikan terhadap kadar MDA dan GSH, baik pada hari ke-3, hari ke-5 maupun hari ke-7. Bila dianalisis secara sendiri-sendiri, ternyata pada hari ke-3, tidak didapatkan penurunan kadar MDA yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok *Chloroquine*, dan kelompok NAC. Pada hari ke-3 penurunan MDA signifikan pada kelompok kombinasi klorokuin dan NAC 1 mg/gBB. Hal ini disebabkan karena pada hari ke-3, pengobatan baru berjalan, sehingga terjadinya penurunan MDA adalah pada kelompok yang diberi kombinasi klorokuin dengan NAC dosis tinggi, yaitu 1 mg/gBB. Bila dibandingkan dengan parasitemia, pada hari ke-3, pada kelompok ini memang parasitemia sudah sangat menurun, sehingga dengan demikian produksi MDA-pun menurun. Pada hari ke-7, didapat penurunan MDA yang signifikan antara

kelompok kontrol dengan kelompok kombinasi *Chloroquine*+NAC, penurunan MDA ini semakin signifikan dengan penambahan dosis NAC.

Pada hari ke-3, kadar GSH tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol dengan kelompok *Chloroquine*, tetapi terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok Nac dan kelompok kombinasi klorokuin dan NAC. Hal yang sama terjadi pada hari ke-5 dan hari ke-7, dimana kadar GSH juga menunjukkan perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok NAC dan antara kelompok kontrol dengan kelompok kombinasi klorokuin dan NAC. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok NAC, adanya NAC yang merupakan prekursor glutathion menyebabkan kadar GSH hepar pada kelompok ini meningkat dengan tajam. Walaupun pada kelompok ini ternyata tidak didapatkan penurunan MDA, hal ini dapat disebabkan karena peningkatan GSH hepar tidak cukup kuat untuk mengikat MDA yang banyak dihasilkan di darah, sehingga kadar MDA relatif tetap.

GSH merupakan antioksidan golongan *sulfhydryl* yang berfungsi mengikat radikal hidroksil. Walaupun pada infeksi malaria, radikal yang banyak dihasilkan adalah radikal oksigen, tetapi reaksi radikal oksigen dengan antioksidan SOD akan menghasilkan H_2O_2 yang akan bereaksi dengan Fe yang dihasilkan dari proses degradasi hemoglobin untuk kemudian menghasilkan radikal hidroksil, sehingga pemberian antioksidan yang meningkatkan kadar GSH tetap diperlukan (Halliwell & Gutteridge, 1998) (Oliviera, 2002). Pada kelompok NAC dapat dilihat bahwa NAC dapat menurunkan aktivitas radikal bebas, yaitu dengan meningkatkan kadar GSH, baik dosis NAC 0,25; 0,5 maupun dosis 1 mg/gBB semuanya dapat menurunkan aktivitas radikal bebas dengan cara meningkatkan kadar GSH. Sifat antioksidan dari NAC telah banyak dicobakan pada berbagai penyakit. NAC telah terbukti dapat

menurunkan kadar MDA pada penderita gagal ginjal kronis (Trimarchi,*et.al.*,2003), NAC juga terbukti dapat menurunkan proses replikasi virus hepatitis C yang dihubungkan dengan kemampuan NAC sebagai antioksidan dan meningkatkan kadar interferon (Beloqui *et al.*, 1993). Dan yang paling banyak dilaporkan adalah penggunaan NAC sebagai terapi suportif pada penderita AIDS, dimana pada penderita AIDS, NAC terbukti dapat menurunkan komplikasi, meningkatkan imunitas dan menurunkan angka infeksi oleh bakteri (Roederer ,*et.al.*,1993)(Droge , 1993).

Pada kelompok kontrol, kadar MDA mengalami peningkatan dengan bertambahnya hari, dan menunjukkan beda yang signifikan antara hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-7. Hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol, parasitemia mengalami peningkatan, adanya eritrosit yang terinfeksi parasit akan memacu aktivasi makrofag yang kemudian akan menghasilkan radikal bebas sebagai mekanisme pertahanan tubuh dalam melawan parasit. Pada infeksi malaria, kadar MDA meningkat juga disebabkan oleh adanya peningkatan proses peroksidasi asam lemak tak jenuh membran sel akibat melimpahnya radikal hidroksil sebagai hasil reaksi Fenton. Radikal hidroksil juga dihasilkan oleh reaksi radikal oksigen yang bereaksi dengan H₂O₂ yang dikatalisis oleh Fe (reaksi Haber Weiss).



Selain itu radikal bebas juga dihasilkan oleh pemecahan hemoglobin menjadi heme. Ikatan heme dengan Fe dalam eritrosit akan membentuk radikal oksigen dan radikal hidroksil. Sehingga pada infeksi malaria, terbentuk radikal oksigen dan radikal hidroksil yang keduanya akan meningkatkan kadar MDA. Peranan radikal bebas pada penyakit malaria juga telah dibuktikan oleh Griffith, 2001 dan Foldes *et al.*, 1994 , pada kedua penelitian tersebut, didapat hasil bahwa pada infeksi malaria

terdapat peningkatan kadar *malondialdehyde* yang signifikan, baik oleh *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei* maupun *Plasmodium vinckei*.

Pada kelompok kontrol, kadar GSH menurun secara signifikan pada hari ke-5 dan meningkat secara signifikan pada hari ke-7, tetapi secara umum pada kelompok kontrol kadar GSH lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol, GSH menurun sebagai kompensasi atas meningkatnya MDA. Pada hari ke-3, GSH masih tinggi, karena parasitemia masih rendah, pada hari ke-5, GSH makin menurun sejalan dengan meningkatnya MDA. Pada hari ke-7, parasitemia semakin tinggi sehingga tubuh akan mengalami kompensasi untuk memacu antioksidan enzimatik sehingga kadar GSH akan meningkat kembali. Keberadaan radikal hidroksil dan H₂O₂ yang tinggi pada infeksi malaria tentunya akan memacu aktivitas enzim *Glutathione peroxidase*/GPX, sehingga akan terjadi peningkatan sintesa GSH oleh tubuh. Keadaan ini analog dengan keadaan stress oksidan yang lain, dimana dengan paparan glukosa yang tinggi pada endotel pembuluh darah, menunjukkan peningkatan aktivitas *Glutathione Peroksidase*/GPX, katalase, dan ekspresi mRNA GPX dan katalase (Ceriello *et al.*, 1996)

Pada kelompok *Chloroquine*, kadar MDA menurun dengan bertambahnya hari, tetapi penurunan MDA tersebut tidak signifikan, Penurunan kadar MDA pada kelompok *Chloroquine* baru signifikan pada hari ke-7. Hal ini membuktikan bahwa *Chloroquine* mempunyai efek dalam menurunkan kadar MDA dan menurunkan aktivitas radikal bebas pada hari ke-7. Sedangkan dengan uji Tukey ternyata peningkatan GSH pada kelompok *Chloroquine* tidak berbeda dengan kelompok kontrol, sehingga dapat dikatakan bahwa pada kelompok *Chloroquine*, kadar GSH tetap. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Chloroquine* menurunkan kadar MDA bukan

melalui peningkatan sintesa GSH, tetapi akibat parasitemia yang semakin menurun dan efek *Chloroquine* sebagai immunosupresan sehingga radikal bebas yang dihasilkan juga menurun. Jadi titik tangkap *Chloroquine* sebagai antioksidan adalah berhubungan dengan menurunnya aktivitas kemotaksis leukosit sebagai akibat menurunnya parasitemia, sehingga radikal superoksida yang dihasilkan menurun, dengan akibat H_2O_2 dan radikal hidroksil yang dihasilkanpun menurun dengan hasil akhir penurunan kadar MDA (Halliwell & Gutteridge, 1998)(Thomson, 2002). *Chloroquine* juga mempunyai efek antiinflamasi karena dapat menghambat pembentukan IL-1 dan menstabilkan membrane lisosom sehingga terjadi hambatan pengeluaran beberapa protease. Oleh karena itu *Chloroquine* dapat digunakan sebagai antirheumatic. Obat yang berfungsi sebagai antiinflamasi dapat menjadi antioksidan melalui beberapa cara (Halliwell & Gutteridge, 1998):

- Obat penghambat inflamasi cenderung menurunkan produksi ROS/RNS
- Obat diduga secara langsung menjadi *scavenger* ROS seperti OH^- , OOH^- dan $HOCl$. Obat bereaksi secara cepat dengan OH^- , walaupun untuk itu diperlukan konsentrasi yang cukup tinggi
- Obat dapat melapisi ion Fe yang dibutuhkan untuk produksi OH^-
- Obat secara langsung menurunkan ROS melalui fagosit.

Pada kelompok kombinasi *Chloroquine* + NAC, didapatkan penurunan kadar MDA yang signifikan dibandingkan dengan kontrol, dan ini terjadi sejak hari ke-3, dengan penambahan dosis NAC, kadar MDA semakin signifikan penurunannya. Sedangkan kadar GSH pada kelompok ini mengalami peningkatan sejak hari ke-5, dan semakin signifikan dengan penambahan dosis NAC. Hal ini disebabkan karena NAC setelah memasuki tubuh akan menjadi *cysteine*, yang selanjutnya akan

memasuki sel dan memasuki metabolisme *glutathione*. Sehingga dikatakan bahwa NAC merupakan *precursor glutathione* (GSH). Kemampuan NAC dalam memacu produksi GSH telah dibuktikan oleh Yim *et al.*, 1994, yang memberi NAC 0,6-1mM pada kultur sel ginjal, ternyata dalam waktu 90 jam terdapat peningkatan *glutathione* tereduksi dan *glutathione* total dengan hasil akhir peningkatan proliferasi sel T limfosit. Hal yang sama juga telah dicoba pada penderita AIDS yang mendapat terapi NAC oral 600mg/hari, ternyata kadar *glutathione* intrasel meningkat secara signifikan dan akhirnya menurunkan proliferasi virus HIV.(Roederer *et al.*,1993)(Rossa *et al.*,2000).

Adanya efek antioksidan dari *Chloroquine* yang ditambah dengan antioksidan dari NAC menyebabkan kedua obat tersebut bekerja secara sinergi sehingga kadar MDA menurun secara signifikan pada hari ke-7. Hal ini ditunjang dengan peningkatan kadar GSH yang membuktikan bahwa NAC dapat menstimulasi produksi GSH dan menurunkan aktivitas radikal bebas pada infeksi malaria.

5.2.2 Pengaruh kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* terhadap aktivitas Fagositosis Makrofag

Pada penelitian ini didapatkan jumlah rata-rata makrofag aktif berbeda nyata antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan. Demikian juga perbedaan hari juga menunjukkan perbedaan yang nyata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakuan, baik itu *Chloroquine*, NAC maupun kombinasi *Chloroquine* + NAC mempengaruhi aktivitas fagosit baik pada hari ke-3, ke-5 maupun hari ke-7.

Pada kelompok kontrol, terjadi peningkatan aktivitas fagositosis makrofag yang signifikan dengan bertambahnya hari. Hal ini disebabkan karena dengan

bertambahnya eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium*, maka tubuh akan menstimulasi sel-sel imun termasuk makrofag sebagai komponen imunitas seluler untuk meningkatkan aktivitasnya. Dengan bertambahnya parasitemia, maka makrofag yang diproduksi akan semakin tinggi dan aktivitasnya akan meningkat. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Siagian, 2003 yang meneliti pengaruh pemberian TNF- α terhadap proses eritrofagositosis *Plasmodium falciparum*. Ternyata didapatkan bahwa pada infeksi malaria, eritrofagositosis meningkat secara signifikan bila dibandingkan dengan kontrol. Adanya infeksi eritrosit oleh *Plasmodium* akan merangsang sel T menjadi aktif. Selanjutnya akan terjadi pengeluaran sitokin-sitokin tertentu serta aktivasi sistem komplemen untuk kemudian akan mengaktifkan limfosit T dan limfosit B. Dengan demikian jumlah makrofag yang diproduksi akan meningkat sebagai kompensasi tubuh untuk mengeliminasi parasit (Abbas, 2000) (Roitt, 2003)

Pada kelompok mencit malaria yang diberi terapi dengan *Chloroquine*, aktifitas fagositosis mengalami penurunan, walaupun penurunan ini baru signifikan pada hari ke-7. Penurunan ini disebabkan oleh karena :

1. Pada kelompok mencit malaria yang diterapi *Chloroquine*, parasitemia mengalami penurunan secara nyata antara hari ke-3, ke-5 dan ke-7. Dengan penurunan ini tentunya juga makrofag yang aktif akan berkurang. Tubuh tidak lagi menstimulasi sel-sel imunnya, dalam hal ini sel T berproliferasi, sehingga secara otomatis makrofag yang dihasilkan juga akan berkurang. Jadi di dalam tubuh terdapat mekanisme *feedback* yang berfungsi mengontrol sel-sel imun agar terjaga keberadaannya dalam melawan parasit (Abbas, 2010).
2. *Chloroquine* dikatakan mempunyai efek *mild immunosuppressant*. *Chloroquine* disamping terakumulasi dalam eritrosit terinfeksi *Plasmodium*, *Chloroquine*

juga terakumulasi dalam sel-sel lain, termasuk sel darah putih dan limfosit. Sesuai sifatnya yang asam, maka keasaman sel akan bertambah sehingga mempengaruhi stabilitas membran dan aktivitas beberapa protease, termasuk di dalam limfosit. Akibatnya jumlah limfosit yang berproliferasi menjadi terganggu dan berkurang. Hal ini tentunya akan mempengaruhi juga makrofag yang diproduksi, sehingga pada kelompok yang diberi *Chloroquine*, jumlah makrofag menurun (Thomson,2002).

Efek immunosupressant ini baru terjadi pada hari ke-7, karena pada saat itu *Chloroquine* telah terakumulasi maksimal dalam sel-sel imun dan menimbulkan penurunan jumlah makrofag.

Pada mencit malaria yang diberi terapi dengan *N-Acetyl Cysteine*, jumlah makrofag memang meningkat, tetapi peningkatan ini baru signifikan pada dosis NAC 1 mg/gBB dan baru tercapai pada hari ke-7. Pada hari ke-3 dan ke-5, walaupun jumlah makrofag yang aktif meningkat, tetapi peningkatan tersebut tidak signifikan. Hal ini disebabkan karena pada dosis NAC 1mg/gBB, NAC baru mempunyai efek dalam menstimulasi proliferasi sel T sehingga jumlah makrofag meningkat. NAC telah diketahui dapat menstimulasi aktivitas makrofag dengan cara meningkatkan jumlah *glutathione* intrasel. *Glutathione* diketahui berperan penting dalam menstabilkan membran sel, dan sebagai mekanisme pertahanan terhadap keberadaan oksidan. Walaupun *glutathion* terbanyak ditemukan di dalam eritrosit, tetapi *glutathion* dalam dosis tertentu juga memegang peranan dalam stabilitas membran sel leukosit dan limfosit(Halliwell & Gutteridge, 1998). Selain itu *glutathione* juga dapat meningkatkan jumlah sel T CD4 dan sel T CD 8 yang beredar dan hal ini diduga berkaitan dengan kemampuannya dalam menghambat produksi IL-2 yang bersifat sitotoksik (Kinscherf *et al.*, 1994)

Pada kelompok yang diberi kombinasi *Chloroquine* dan NAC, jumlah makrofag yang aktif meningkat secara signifikan pada hari ke-7. Pada hari ke-3, dan ke-5, belum ada peningkatan jumlah makrofag yang signifikan, baik antara kelompok kontrol dengan kelompok NAC, maupun antara kelompok kontrol dengan kelompok kombinasi *Chloroquine*+NAC. Sedangkan pada hari ke-7, jumlah makrofag aktif meningkat secara signifikan pada kelompok yang diberi NAC dosis 1mg/gBB dan pada kelompok kombinasi. Peningkatan jumlah makrofag tertinggi pada kelompok kombinasi *Chloroquine*+NAC 0,5 mg/gBB. Jadi dapat dikatakan bahwa, peningkatan aktivitas makrofag baru tercapai pada hari ke-7. Hal ini disebabkan karena pada waktu itu, NAC mulai terakumulasi dalam darah dan baru bekerja meningkatkan proliferasi limfosit T dan proliferasi makrofag.

Walaupun *Chloroquine* sendiri justru menurunkan jumlah makrofag, tetapi pada penelitian ini kombinasi *Chloroquine* dan NAC tetap secara signifikan meningkatkan aktifitas makrofag. Nampaknya hal ini disebabkan adanya interaksi kedua obat tersebut secara farmakodinamik sehingga ketika diberikan bersama-sama, kedua obat tersebut dapat meningkatkan aktivitas fagositosis.

Kemampuan NAC dalam meningkatkan aktivitas makrofag tidak terlepas dari fungsinya sebagai antioksidan. NAC telah dikenal sebagai salah satu obat yang dapat meningkatkan kadar *glutathione* intrasel (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Glutathione sendiri sangat penting dalam pertahanan sel terhadap adanya oksidan. *Glutathione* merupakan salah satu komponen yang menstabilkan membran sel terhadap kerusakan akibat adanya radikal bebas. *Glutathione* memainkan peran yang sangat penting dalam produksi ATP dan proses *repair* DNA mitokondria pada sel yang terpapar stress oksidatif (Phelps *et al.*, 2004). Pada infeksi malaria, radikal yang dihasilkan terutama adalah radikal hidroksil yang sangat toksik terhadap sel,

baik itu sel darah merah yang terinfeksi *Plasmodium*, maupun sel makrofag yang terstimulasi oleh *Plasmodium*. Radikal hidroksil juga toksik terhadap sel-sel limfosit T yang berproliferasi oleh karena rangsangan terhadap mikroorganisme. Dengan adanya NAC, maka *glutathione* sel meningkat, sehingga sel makrofag dan sel T sebagai komponen sistem imun menjadi lebih tahan terhadap radikal hidroksil yang dihasilkan selama infeksi, sehingga jumlah makrofag yang dihasilkanpun lebih banyak daripada kelompok kontrol, kelompok *Chloroquine* maupun kelompok NAC. Hal ini ditambah oleh fungsi antimalaria dari *Chloroquine* dan NAC yang secara poten bekerja secara sinergi mengeliminasi parasit, dan menurunkan aktivitas radikal bebas, sehingga makrofag rusak semakin menurun, dengan kata lain jumlah makrofag aktif semakin meningkat.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :

1. Kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* memberi efek sinergi terhadap penurunan aktivitas radikal bebas hepar selama infeksi *Plasmodium berghei*, yang ditunjukkan dengan penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) dan peningkatan kadar *glutathione*(GSH). Efek sinergi ini tercapai pada hari ke-7 dan didapatkan pada dosis kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* 0,5 dan NAC 1 mg/gBB.
2. Kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* diduga memberi efek potensiasi terhadap aktivitas fagositosis makrofag selama infeksi *Plasmodium berghei*, efek ini tercapai pada hari ke-7 setelah pemberian obat.

6.2 Saran

1. Penelitian ini perlu dilanjutkan lagi dengan beberapa pendekatan, yaitu :
 - Penambahan jumlah kelompok penelitian, pemberian dosis yang bertahap tidak hanya pada kelompok NAC tetapi juga pada kelompok *Chloroquine* sehingga kita bisa mengetahui dosis optimum *Chloroquine* dan NAC yang memberikan efek sinergi.
 - Lama penelitian perlu ditambah, sampai tercapai parasitemia 0%

2. Perlu diteliti kadar TNF- α , dan beberapa sitokin lain yang diproduksi oleh makrofag sehingga dapat dibuktikan keterlibatan sitokin dalam kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine*.
3. Perlu diteliti aktivitas sel-sel imun lain dalam eliminasi *Plasmodium*, karena proses eliminasi *Plasmodium* melibatkan banyak sel selain makrofag.
4. Perlu diteliti kadar *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI), sehingga pengaruh kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* tersebut titik tangkapnya terhadap radikal oksigen ataukah radikal hidroksil.
5. Kadar hemozoin juga diperlukan untuk mengembangkan penelitian ini, karena proses degradasi heme memainkan peran yang sangat penting dalam patogenesis malaria dan keterlibatan radikal bebas.
6. Pemberian *Chloroquine* yang dikombinasi dengan *N-Acetyl Cysteine* dapat dipertimbangkan pada penderita malaria, untuk meningkatkan proses eliminasi *Plasmodium* dan mencegah terjadinya komplikasi pada infeksi oleh *Plasmodium*.
7. Penelitian lebih lanjut berupa uji klinis terhadap manusia, yang diberi kombinasi *Chloroquine* dan *N-Acetyl Cysteine* mengingat kombinasi kedua obat ini dapat memberi efek sinergi dalam menurunkan derajat parasitemia.
8. Penelitian lebih lanjut dengan obat antimalaria selain *Chloroquine* diperlukan untuk memberi hasil yang terbaik pada pengobatan malaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, K.A.; Lichtman, A.H. and Prober, 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. WB Sanders Company; 235-247
- Behr J, Maier K, Degenkolb B, Antioxidative and Clinical Effects of High Dose N-Acetyl Cysteine in fibrosing Alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 1897-1901
- Beloqui O, Prieto J, Suarez M, 1993. N-Acetyl Cysteine Enhances the Response to interferon-alpha in Chronic Hepatitis C: a pilot study. *J Interferon Res* 13:279-282
- Ceriello A, Russo P, Amstad P, 1996, High Glucose Antioxidant Enzyme in Human Endothelial Cell in Culture. *Diabetes* vol. 45; 471-477
- De Vries N, De Flora S. N-Acetyl Cysteine. *J Cell Biochem Suppl* 17F; 270-277; 1993
- Departemen Kesehatan RI, Badan Litbangkes, 1990, Pedoman Pengobatan Malaria
- Dolezal T and Krsiak M, 2001. *Augmentation of Analgesic Effect of Ibuprofen by Alprazolam in Experimental Model of Pain*.
In <http://www.biomed.cas.cz/physiolre/2002/issue/pdf/dolezal.pdf>
- Droge W, 1993. *Cysteine and Glutathione Deficiency in AIDS Patients: a rationale for the treatment with N-acetyl Cysteine*. *Pharmacology* 46: 61-65
- Egan JT, 2003, *Structure-Function Relationships in Chloroquine and Related 4-Aminoquinoline Antimalarials*, in <http://www.chloroquine.com/aminoquinolines/article>. Diakses pada tanggal 20 April 2003, jam 16.00
- Flower, R.J., 1973. Quantitative Determination of Prostaglandin and Malondialdehyde Formed by Arachidonate Oxygenase (Prostaglandin Synthetase) System of Bovine Seminal Vesicle. *Prostaglandin* Vol. 4; 325-40
- Foldes J, Matyi A, Matkovics B, 1994. The Role of Free Radicals and Antioxidative Enzymes in erythrocytes and Liver cells in the course of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei* infections. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 41(2): 153-161
- Fitri LE, Murwani, Suhendro W, 2001, Hubungan antara pemberian klorokuin dan vitamin C dengan derajat parasitemia dan aktivitas makrofag peritoneal

- mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*, *Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya*
- Fitri LE, 2004. Analisis Patogenesis Malaria dengan Komplikasi: Tinjauan Molekuler terhadap Peran Molekul Adhesi Eritrosit Terinfeksi *Plasmodium falciparum* Isolat Malang dan Keterlibatan Senyawa Oksigen Reaktif. Disertasi. Universitas Brawijaya Malang
- Ginsburg H, Ward SA, Bray PG, 1999. An Intergrated Model of Chloroquine Action. *Parasitologi Today* 15, 357
- Gunawan S, 2000. *Epidemiologi Malaria dalam Malaria : Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*, EGC, Jakarta
- Hunt, N.H, Kopp M, Stocker R. 1992. *Free Radicals and Antioxidants in Malaria*. Lipid Soluble Antioxidants : Biochemistry and Clinical Application. A.S.H Ong & L. Packer (eds.) p. 337-53
- Halliwell, B ; Gutteridge, J.M.C.,1998. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edition. Oxford University Press: 140-148, 497-499
- Harijanto, P.N. 2000, *Malaria : Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*, EGC, Jakarta
- Health Forum, 2004. *What is the Intractions between Drugs and Chinese Herbs* (Online), (<http://aac.asm.org/cgi/content/full/46/7/2244>), diakses pada tanggal 12 April 2005
- Janse and Waters. The *Plasmodium berghei* Research Model of Malaria. *Parasitologi Today* 11;138-143,2002
- Kinscherf R, Finsbach T, Mihm S. Effect of Glutathione depletion and Oral N-Acetyl Cysteine treatment on CD4+ and CD 8+ cells. *FASEB J* 8: 448-451; 1994
- Klemba M and Goldberg DE, 2002. Biological Roles of Proteases in Parasitic Protozoa. *Annu Rev Biochem* 71, 275-305.
- Lewis JG, 1985. Isolation of Alveolar Macrophage, Peritoneal Macrophage and Kupffer Cell. *Methods in Immunotoxicology*(burleson G.R et.al eds) vol 2, Wiley-Liss Inc.Pub. New York. P 15-26
- Manson-Bahr, Bell, 1987. *Manson's Tropical Diseases*, 19th ed. English Language Book Society. P. 2-54
- MacDonald SM, Bhisuttibhan J, Shapiro TA, Rogerson Sj, 2001. Immune Mimicri in Malaria : *Plasmodium falciparum* secretes of Function Histamine Releasing

- Factor Homolog in vitro and in vivo. *PNAS*, USA September 11; 98(19): 10829-10832
- Nugroho T, Wagey M, 2000. *Siklus Hidup Plasmodium Malaria dalam Malaria . Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Peranganan*, EGC, Jakarta
- Oliveira L. Pedro, 2002. *Pasteur and Reactive Oxygen Species, is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood feeding parasites*<http://www.elsevier.com/febs/520/19/21/article.html>
- Roedereer M, Staal FJ, Ela SW, Herzenberg LA, 1993. N- Acetyl Cysteine: potential for AIDS therapy. *Pharmacology* 46:121-129
- Roitt Ivan, 2003. *Imunologi. Essential Immunology*, edisi 8, Penerbit Widya Medika, Jakarta
- Rosenthal PJ , 2002. Proteases of Malaria Parasites : New Targets for Chemotherapy, *Emerging Infectious Disease* Vol. 4 No.1
- Rosenthal PJ and Goldsmith RS, 2001. *Antiprotozoal Drugs. In Basic and Clinical Pharmacology*, 8th ed, McGraw-Hill Companies Inc. (On-line edition available through *Stat!Ref Books* at the [Tulane Medical Library](#))
- Rossi R, Milzani A, Donne ID, 2002. Blood Glutathione disulfide: In Vivo Factor or in Vitro Artifact. *Clinical Chemistry*, 48 : 7742-753
- Siagian LR, 2003. Pengaruh Malaria dan Tumor Nekrosis Faktor- α dalam meningkatkan Aktivitas Fagosit Makrofag Malaria terhadap Eritrosit Terinfeksi *Plasmodium falciparum*- Tesis. Malang: Universitas Brawijaya
- Simkeviciene V, Straukas J, Uleckiene S, 2002. N-Acetyl Cysteine as a possible cancer chemopreventive agents in Murine Models. *Acta Biol Hung* 53(3):293-8
- Sukarban, S.; Zunilda S.B.,1995. *Obat Malaria. Dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Hal. 547-548
- Supargiyono, 1993. Production, Proliferation And Functional Activities Of Mononuclear Phagocytes During *Plasmodium vinckei* Pettei Infection in Mice. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in the Faculty of Science of University of London, London
- Suwarni, 1994. Pengaruh pemberian Klorokuin terhadap Jumlah Parasit pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*, *Cermin Dunia Kedokteran*, No.94

- Stout DR, Suttles J. T Cell Signaling of Macrophage Function in Inflammatory Disease. *Bioscience*, vol. 2, p.197-206; May 1997
- Tjokroprawiro A, 1993. *Radikal Bebas : Aspek Klinis dan Kemungkinan Aplikasi Terapi dalam Simposium Oksidan dan Antioksidan*. Perhimpunan Ahli Penyakit Dalam Indonesia, Surabaya
- Treeprasertsuk S, Kruudsod S, Tosukhowong T. 2003. *N-Acetyl Cysteine in Severe falciparum malaria in Thailand*, *Scutheast Asian J Trop Med Public Health*. Mar. 34 : 37-42
- Trimarchi H, Mongitore MR, Baglioni P, Forrester M, Freass EA, 2003. N- Acetyl Cysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis. *Clin Nephrol*, Jun;59(6):441-6.
- Thomson, 2002. *Chloroquine, systemic. VA Classification*. In <http://www.pjbs.org/pjonline/fn.57.pdf>. Diakses pada tanggal 3 Januari 2005, jam 20.00
- Vechiarelli A, Dottorini M, Pietrella D. 1994. Macrophage Activation by N-acetyl Cysteine in COPD Patients. *Chest* Vol.105 : 806-811
- Viswanathan, R., 1998. *Plasmodium falciparum*. DJW's HomePage. http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_1998/P-falciparum.html
- Watt G, Jongsakul K, Ruangvirayuth R, 2002. A Pilot Study of N-Acetyl Cysteine as adjunctive therapy of Severe Malaria. *QJM*; May; 95(5): 285-90
- Waters SL, Taverne J, Po-Chun Tai, Spry JF, Playfair JS, 1987. Killing of *Plasmodium falciparum* by Eosinofil Secretory Product. *Infection and Immunity*. Vol 55 No 4, p. 887-881
- White NJ, Ereman JG, 2001. *Malaria and Babesiosis : Disease Caused by Red Blood Cell Parasites ; Harrison's Principles of Internal Medicines, 15th ed. Volume 1*, The McGraw Hill Company, New York
- Wiser F Thomas, 1999. *Biochemistry of Plasmodium*. Tulane University, New York in <http://www.Biochemistry/Plasmodium/html>.
- Yim CY, Higgs JB Jr, Mc Gregor JR, 1994. Use of N-Acetyl Cysteine to Increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL-2. *J Immunol* 152:5796-5805

Lampiran I

Cara Pembuatan Inokulan *Plasmodium*

Inokulasi dilakukan secara intra peritoneal (i.p) sebanyak 10^7 parasit dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit. Jumlah eritrosit per ml darah dan parasitemia mencit donor yang akan ditransfer parasitnya terlebih dahulu dihitung.

A. Menghitung jumlah eritrosit/ml darah

1. Ambil darah dari ujung ekor mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 10 ul dengan mikropipet yang *tip*-nya telah dibasahi dengan antikoagulan heparin.
2. Tambahkan 990 ul PBS sehingga menghasilkan larutan I
3. Ambil 100ul larutan I dan tambahkan 990 PBS sehingga menghasilkan larutan II. Jadi telah dilakukan pengenceran 10^3 kali
4. Hitung jumlah eritrosit dalam kamar hitung *eri Naubauer* dengan rumus :

$$\text{Jumlah eritrosit/ml darah} = N(\Sigma \text{ eritrosit dalam 5 kotak}) \times 5 \times 10^4 \times 10^3 \text{ (pengenceran)}$$

Keterangan : Isi larutan PBS untuk volume 1 liter adalah NaCl 8 g;

KCl 0,2g; Na_2HPO_4 1,15g; KH_2PO_4 0,2g dan aquadest 1 liter

B. Menghitung parasitemia (P%)

1. Buat hapusan darah dari ujung ekor mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei*
2. Pulas dengan Giemsa
3. Amati dengan mikroskop pembesaran 1000x (dengan minyak imersi)
4. Hitung jumlah parasit di dalam eritrosit per 1000 eritrosit
5. Persentase parasitemia (P%) dihitung dengan rumus :

$$P\% = \frac{\Sigma \text{ PRBC} \times 100\%}{1000 \text{ eritrosit}}$$

C. Cara membuat konsentrasi parasit 10⁷/0,2 ml larutan darah

1. Hitung jumlah parasit per ml dengan rumus :

$$\text{Parasit/ml} = P\% \times \text{jumlah eritrosit}$$

2. Menentukan pengenceran darah mencit yang akan ditransfer parasitnya (untuk inokulasi secara intra peritoneal ditetapkan konsentrasi parasit 10⁷ parasit dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit sehingga konsentrasi parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi adalah 5 x 10⁷ parasit)

$$\text{Rumus pengenceran} = \frac{\Sigma \text{ parasit/ml darah mencit yang akan ditransfer parasitemianya}}{\Sigma \text{ parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi}}$$

3. Diambil darah dari ujung ekor mencit yang akan ditransfer parasitnya, dan mengencerkannya dengan larutan M+ sesuai dengan hasil perhitungan.

Hasil : Jumlah eritrosit = 70. 10⁸/ml

Parasitemia = 20%

$$\begin{aligned} \text{Jumlah parasit} &= 20 \times 70.10^8 \\ &= 1400.10^8 \end{aligned}$$

$$\text{Pengenceran} = \frac{1400.10^8}{5.10^7} = 2800 \times$$

(= 10ul darah mencit dalam 28 ml larutan M+ atau 5ul darah mencit dalam 14 ml larutan M+)

Lampiran 4

Cara isolasi dan pengukuran fagositosis makrofag peritoneal

A. Cara isolasi dan kultur makrofag :

1. Mencit dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform
2. Mencit diletakkan dengan posisi terlentang, kulit dibersihkan dengan alcohol 70%
3. Kulit bagian perut dan selubung peritoneum dibuka dan dibersihkan dengan alcohol 70%.
4. Sebanyak 10 ml medium tumbuh diinjeksikan ke dalam rongga peritoneum dan digoyang selama 3 menit.
5. Medium tumbuh tersebut kemudian diaspirasi kembali dengan jarum suntik dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge yang diletakkan diatas es.
6. Suspensi sel peritoneal dihitung dengan hemositometer dan ditambahkan medium tumbuh sehingga didapatkan suspensi yang mengandung 2×10^5 sel/ml, kemudian dimasukkan ke dalam mikroplate 24 sumuran sebanyak 1ml/sumur.
7. Sel makrofag dibiarkan melekat selama 2 jam. Sel-sel yang tidak melekat dibuang, sel-sel yang melekat dicuci dengan RPMI tanpa FBS (*Fetal Bovine Serum*) sebanyak 2 kali, kemudian diinkubasi dengan medium tumbuh.

B. Cara uji fagositosis Makrofag peritoneal :

Uji fagositosis makrofag peritoneal non spesifik dilakukan in vitro menurut Supargiyono (1993) dengan menggunakan *latex beads* diameter 3 μ m. Setelah dicuci dengan PBS, *latex beads* diresuspendikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi 10^6 /ml. Kemudian dilakukan :

1. Cuci makrofag yang telah dikultur 20-24 jam sebelumnya dengan RPMI sebanyak 2x
2. Lakukan uji sebagai berikut : 200 μ l/ 500 μ l latex yang mengandung kepadatan sel latex 10-20 kali kepadatan sel-sel makrofag tiap sumuran
3. Inkubasikan ke dalam incubator 37°C CO₂ selama 1 jam

4. Supernatan dibuang
5. Cuci dengan PBS 3x kemudian keringkan
6. Fiksasi dengan menggunakan methanol absolut 30 detik, kemudian keringkan.
7. Tahap Pewarnaan : tambahkan Giemsa 20-25% selama 30 menit; kemudian cuci dengan destilated H₂O; Angkat coverslip dari sumuran keringkan pada suhu ruangan; periksa dibawah mikroskop cahaya pembesaran 400x.
8. Uji fungsi fagositosis makrofag secara kuantitatif : dalam 200 makrofag dihitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex dan berapa yang tidak memfagositosis partikel latex kemudian ditentukan jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap sel makrofag.

Lampiran 3

Data hasil pengukuran jumlah makrofag yang menfagositosis latex

Perlakuan	makrofag hari ke-								
	3			5			7		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
I	65	63	75	65	74	88	65	92	84
II	73	50	83	65	61	103	63	57	60
IIIA	60	53	71	72	64	75	84	93	78
IIIB	63	73	78	75	32	84	65	100	98
IIIC	83	73	90	65	93	87	100	105	94
IVA	78	34	82	100	114	105	105	120	98
IVB	77	93	80	104	110	112	112	145	115
IVC	65	90	68	122	113	82	115	133	104

Lampiran 11
 Hasil Analisis Data Makrofag

Multivariate Tests^b

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
PERLAKUA	Pillai's Trace	2.154	5.095	24.000	48.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	19.510	24.000	41.205	.000
	Hotelling's Trace	130.342	68.792	24.000	38.000	.000
	Roy's Largest Root	122.357	244.713 ^a	8.000	16.000	.000

a. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

b. Design: PERLAKUA

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	makrofag 3 hari	193415.667 ^a	8	24176.958	173.519	.000
	makrofag 5 hari	203737.667 ^b	8	25467.208	157.732	.000
	makrofag 7 hari	204071.667 ^c	8	25508.958	190.959	.000
PERLAKUA	makrofag 3 hari	193415.667	8	24176.958	173.519	.000
	makrofag 5 hari	203737.667	8	25467.208	157.732	.000
	makrofag 7 hari	204071.667	8	25508.958	190.959	.000
Error	makrofag 3 hari	2229.333	16	139.333		
	makrofag 5 hari	2583.333	16	161.458		
	makrofag 7 hari	2137.333	16	133.583		
Total	makrofag 3 hari	195645.000	24			
	makrofag 5 hari	206321.000	24			
	makrofag 7 hari	206209.000	24			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .983)

b. R Squared = .987 (Adjusted R Squared = .981)

c. R Squared = .990 (Adjusted R Squared = .984)