

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Salah satu penyakit infeksi menular yang saat ini masih menjadi masalah kesehatan dunia adalah malaria. Tercatat pada tahun 2012 terdapat 104 negara yang dapat digolongkan sebagai negara endemis malaria (WHO, 2012). Terdapat sebanyak 247 juta kasus malaria di seluruh dunia dan jumlah kematian yang disebabkan oleh malaria telah melampaui angka 1 juta kematian pada tahun 2008 (WHO, 2010). Indonesia masih dapat dikatakan beresiko terhadap penyakit malaria dengan jumlah daerah endemis malaria di Indonesia mencapai angka 73,6% dari jumlah keseluruhan daerah di Indonesia (Depkes RI, 2008). Kasus baru malaria di Indonesia pada tahun 2009/2010 terdiagnosis sejumlah 22,9 per 1000 penduduk Indonesia, dengan kasus terbanyak ada di Papua dan juga Nusa Tenggara Timur (Risksedas RI, 2010). Selama periode 2005-2010, jumlah prevalensi malaria memang sudah mengalami penurunan sebanyak 53% dari awalnya 437.323 kasus menjadi 229.819 kasus, namun hal ini dinilai masih kurang baik dan butuh strategi yang lebih baik lagi dalam penanganannya mengingatangka prevalensi tersebut masih tinggi (WHO, 2011<sup>b</sup>).

Beberapa tahun yang lalu telah ditemukan parasit malaria yang resisten terhadap Artemisinin. Artemisinin merupakan pengobatan paling ampuh yang ada pada saat ini untuk pengobatan *Malaria Falciparum* (WHO, 2011<sup>b</sup>). Pengobatan malaria pada manusia dalam bentuk vaksin belum ada yang menunjukkan hasil memuaskan hingga saat ini (Crompton *et al*, 2010). Selama beberapa dekade, penanganan malaria sangat bergantung pada obat-obatan,

namun evolusi yang cepat dan penyebaran parasit yang resisten terhadap pengobatan malaria telah mengakibatkan peningkatan angka morbiditas dan mortalitas di daerah endemis malaria sehingga perkembangan target obat/vaksin untuk malaria sangat dibutuhkan (Timothy *et al*, 2011).

Berdasarkan pada permasalahan malaria diatas, diperlukan pengembangan obat malaria baru mengingat artemisinin, yang merupakan obat lini pertama dalam pengobatan malaria, telah ditemukan resistensinya baik monoterapi maupun kombinasi. Proteasom, protein katalitik yang penting dalam regulasi protein pada sel untuk menjaga kehidupan *Plasmodium sp.*, merupakan suatu target baru yang potensial untuk terapi penyakit malaria. Studi terdahulu menunjukkan bahwa pemberian terapi untuk penghambatan terhadap proteasom menyebabkan terhambatnya pertumbuhan parasit (Kreidenweiss *et al*, 2008). Penelitian sebelumnya pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* juga telah menunjukkan adanya berbagai efek yang timbul terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* setelah pemberian isolat bakteri *Streptomyces hygroscopicus* yang mengandung eponemycin, suatu inhibitor dari Proteasom. Efek yang timbul diantaranya adalah penurunan derajat parasitemia dan kerusakan morfologi parasit (Rivo *et al*, 2013).

Pada penelitian ini akan dikembangkan suatu antibodi terhadap proteasome untuk menghambat perkembangan parasit secara *in vitro* dengan harapan sebagai kandidat perkembangan vaksin malaria.

## 1.2 Perumusan Masalah

Apakah pemberian Anti-Proteasom ubiquitin dapat menurunkan derajat parasit dan mempengaruhi morfologi parasit kultur *Plasmodium falciparum* 3D7.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh pemberian Anti-Proteasom ubiquitin terhadap penurunan derajat parasit dan perubahan morfologi kultur *Plasmodium falciparum* 3D7.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini dapat dijadikan dasar teori dalam pengembangan mekanisme target obat/vaksin anti malaria yang memanfaatkan isolat proteasome 20S dari *Plasmodium falciparum*.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat dijadikan dasar serta referensi dalam pengembangan isolat proteasom 20s dari *Plasmodium falciparum* dalam kepentingan penelitian lain, serta dapat dijadikan sebagai referensi untuk pengembangan kandidat terapi malaria baru demi mengatasi tingginya angka kejadian malaria.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Malaria

##### 2.1.1 Etiologi Malaria

Ada 5 spesies parasit malaria yang menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* dan *Plasmodium Knowlesi* (Singh *et al*, 2004 ; Sulistyaningsih *et al*, 2010). Masing-masing spesies memiliki karakteristik berbeda yang dipengaruhi beberapa faktor seperti penyebaran geografis, iklim, serta tempat perindukannya (Depkes RI, 2008). *Plasmodium falciparum* merupakan yang paling berbahaya di antara spesies-spesies yang ada dikarenakan keparahan dan variasi sindrom dari penyakit malaria tertiana maligna (malaria tropika) yang ditimbulkan parasit tersebut lebih buruk dibandingkan dengan 4 spesies lainnya yang kurang berbahaya dan tidak mengancam hidup (Ahmadi, 2008; Hasibuan, 2010). *Plasmodium knowlesi* adalah spesies parasit malaria baru yang ditemukan pada manusia, transmisi dari parasit ini terjadi dari kera ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles leucosphyrus* (Collins & Barnwell, 2012). *Plasmodium knowlesi* memiliki karakteristik yang mirip dengan *Plasmodium malariae*, namun yang membedakan parasit ini adalah pembelahannya yang terjadi setiap hari dan dapat mengakibatkan kematian pada manusia dengan derajat parasitemia yang sangat tinggi (Hellemond *et al*, 2009)

Penularan malaria diperankan oleh nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung *Plasmodium* ketika menggigit manusia. Dari 400 genus *Anopheles* yang ada, 80 spesies terbukti sebagai vektor malaria dan 22 diantaranya dapat ditemukan di Indonesia (Ahmadi, 2008). Insiden dan prevalensi malaria yang tinggi

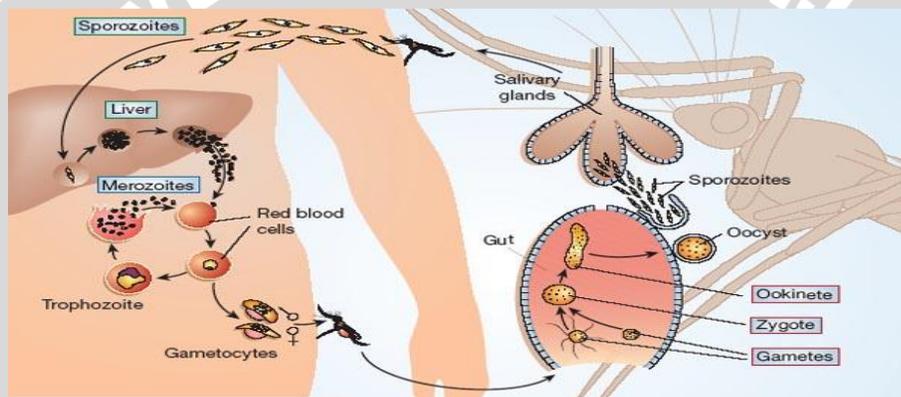
utamanya disebabkan oleh infeksi *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* (Karyana *et al*, 2008).

### 2.1.2 Siklus Hidup Plasmodium

Ada dua fase dalam siklus hidup *Plasmodium sp.* yaitu fase seksual dan aseksual. Fase seksual terjadi di dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina dan fase aseksual terjadi di dalam tubuh manusia. Fase aseksual itu sendiri dibagi menjadi dua, fase pre-eritrosit dan fase eritrosit. Pada saat nyamuk *Anopheles* betina menggigit manusia, sporozoit yang berada di kelenjar ludah masuk ke pembuluh darah manusia. Sporozoit beredar dalam darah lalu kemudian akan menginvasi sel hepatosit. Parasit berkembang menjadi skizon exoeritrositik di dalam hepar selama 7-10 hari. Skizon akan melepaskan ribuan merozoit yang akan menginvasi eritrosit dengan merupturkan sel hepatosit tersebut. Pada spesies *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale*, beberapa parasit akan dorman di dalam hepar menjadi hipnozoit dan sewaktu-waktu dapat keluar sehingga menyebabkan relaps. Sementara itu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium Knowlesi* tidak memiliki fase hipnozoit atau fase dorman (Gillespie dan Pearson, 2001).

Fase eritrosit dimulai ketika eritrosit diinvasi oleh merozoit. Dalam 1 skizon terdapat 10.000-30.000 merozoit yang akan dilepaskan. Dalam fase ini akan terjadi perkembangan dari merozoit menjadi *ring form* yang kemudian perkembangannya akan dilanjutkan menjadi tropozoit matur lalu menjadi skizogoni yang nantinya akan menjadi skizon. Eritrosit yang terinfeksi mengandung 24-32 merozoit dan apabila eritrosit tersebut ruptur maka eritrosit lain akan ikut terinfeksi. Sebagian dari populasi parasit kemudian berkembang menjadi gametosit yang akan menginfeksi nyamuk

yang menggigit manusia dan memulai fase seksual di dalam tubuh nyamuk tersebut. Setelah masuk, gametosit kemudian berkembang menjadi mikrogamet dan makrogamet (jantan dan betina). Keduanya lalu bersatu membentuk zigot. Zigot akan masuk ke dalam midgut dan berkembang menjadi oocyst. Oocyst lalu terus berkembang hingga mengandung ribuan sporozoit. Kemudian oocyst pecah dan melepaskan ribuan sporozoit tersebut ke kelenjar ludah nyamuk dan kemudian akan ditransmisikan ke dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk (Gillespie dan Pearson, 2001).



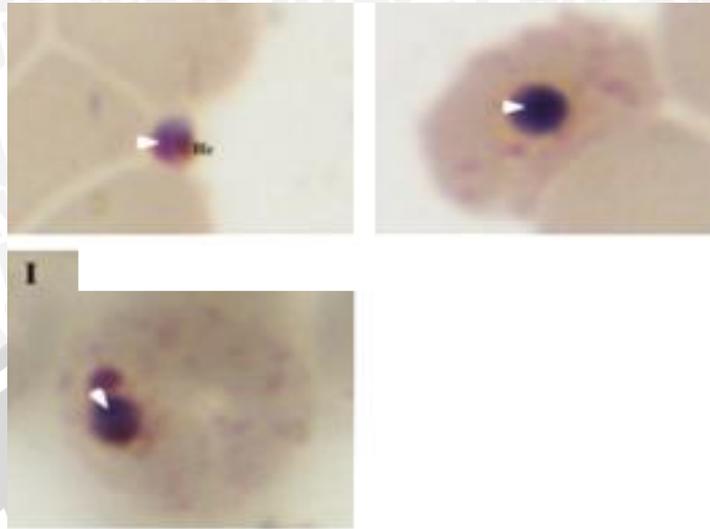
Gambar 2.1 Siklus Hidup Plasmodium (Menard, 2005)

### 2.1.3 Morfologi Plasmodium

Morfologi Plasmodium dapat diidentifikasi menggunakan pewarnaan Giemsa. Morfologi Plasmodium dapat diidentifikasi dengan 2 jenis hapusan darah yang digunakan pada pewarnaan Giemsa, hapusan darah titik tipis dan hapusan darah titik tebal. Beberapa bagian dari Plasmodium yang dapat terlihat adalah sitoplasma, kromatin, vakuola, pigmen, dan eritrosit hospes. Fase perkembangan Plasmodium yang tampak pada eritrosit antara lain: trophozoit, skizon, dan gametosit. Bentuk dari fase trophozoit adalah sebuah cincin, atau terkadang seperti cincin yang tidak utuh. Pada fase ini, ukuran dari Plasmodium bervariasi, dan semakin Plasmodium

bertumbuh pigmen akan muncul. Pigmen ini merupakan produk sampingan dari proses pertumbuhan dan metabolisme hemoglobin oleh Plasmodium dan umumnya pigmen berwarna kuning hingga hitam kecokelatan (WHO, 1991). *Plasmodium falciparum* fase trophozoit mempunyai beberapa ciri-ciri antara lain: berukuran kecil hingga sedang, jumlah Plasmodiumnya cukup banyak, berbentuk cincin atau tanda koma, memiliki 2 kromatin, dan sitoplasmanya cenderung halus. Pada fase skizon, Plasmodium melakukan reproduksi aseksual dengan membelah diri. Pada bentuk fase ini akan terlihat 2 atau lebih titik-titik kromatin dengan penampakan sitoplasma yang jelas. Plasmodium pada fase skizon berukuran kecil, di dalamnya terdapat merozoit dengan bentuk titik-titik hitam yang biasanya berjumlah 12-30 atau bahkan lebih. Pigmen yang terlihat pada fase ini berbentuk *single dark mass*. Plasmodium pada fase gametosit biasanya berbentuk pisang (*banana-shaped*) atau bulat, tergantung dari spesies Plasmodium tersebut (WHO, 1991). Selain itu penampakan pada fase gametosit yang lain adalah pigmen yang kasar dan tersebar merata.

Ketika Plasmodium mengalami stres dan akan berapoptosis akan muncul bentuk *crisis form*. *Crisis form* adalah suatu bentuk yang ditandai dengan ketidaksamaan pada penampakan pertumbuhan Plasmodium, ditandai dengan adanya agregasi pada sitoplasma yang mengakibatkan nukleus menjadi lebih tebal dan gelap (Lopez *et al*, 2010). Bentuk Plasmodium yang rusak dengan hanya terdiri dari kromatin dan pigmen juga sering terlihat pada penampakan fase ini (WHO, 1991).



**Gambar 2.2 Penampakan Crisis Form *P. falciparum* secara Mikroskopis** (Lopez et al, 2010).

Terlihat penampakan *crisis form* pada gambar yang ditandai dengan anak panah putih

Penampakan Plasmodium pada fase-fase perkembangan *Plasmodium vivax* memiliki beberapa perbedaan dengan *Plasmodium falciparum*. Plasmodium fase trophozoit pada *Plasmodium vivax* berukuran kecil hingga besar, bentuknya seperti cincin rusak atau ireguler, memiliki 1 kromatin (terkadang 2), sitoplasmanya tidak merata atau *fragmented*, dan berpigmen halus dan merata. Sementara pada fase skizon, *Plasmodium vivax* memiliki ukuran yang besar, berjumlah cenderung sedikit, merozoitnya berjumlah 12-24 (umumnya 16), dan berpigmen *loose mass*. Untuk fase gametosit bentuknya bulat, berukuran besar, kromatin tunggal dengan tampilan jelas, pigmen yang halus dan tersebar merata. Pada bentuk gametosit rusak hanya terdapat kromatin dan pigmen saja (WHO, 1991).

*Plasmodium ovale* pada fase trophozoit memiliki ukuran yang biasanya lebih kecil dibanding *Plasmodium vivax*, berjumlah sedikit, bentuk bervariasi mulai dari *ring* hingga bulat, kromatin 1 dan *prominent*, sitoplasma reguler, dan berpigmen kasar dan merata. Fase skizon memiliki ciri: berukuran kecil, berjumlah sedikit, terdapat 4-12 merozoit di dalamnya (umumnya 8), berpigmen *concentrated mass*.

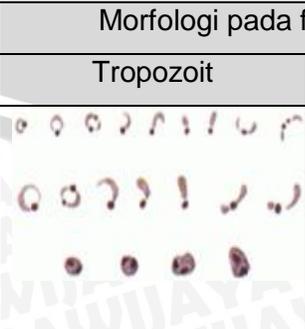
Pada fase gametosit bentuknya bulat, berukuran lebih kecil dibanding *Plasmodium vivax*, memiliki 1 kromatin yang tampak jelas, pigmen yang kasar dan tersebar merata, bentukan gametosit rusak hanya memiliki kromatin dan pigmen saja (WHO, 1991).

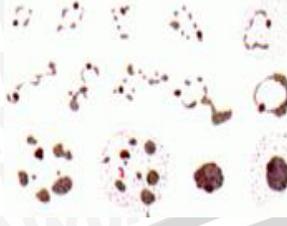
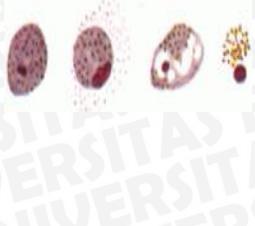
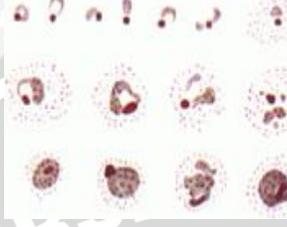
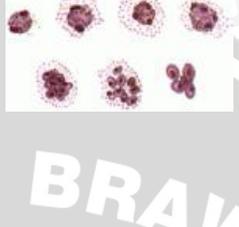
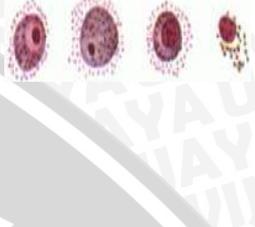
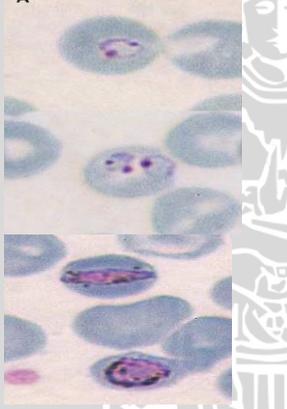
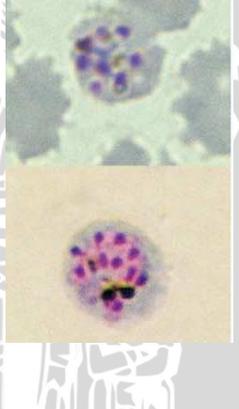
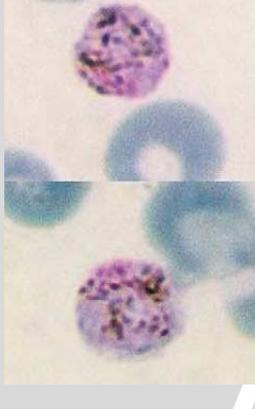
*Plasmodium malariae* fase trophozoit berukuran kecil, berjumlah sedikit, memiliki variasi bentuk *ring* dan bulat, memiliki 1 kromatin, sitoplasmanya besar dan padat, pigmen tersebar merata dan sedikit ada tampakan warna kuning pada bentuk yang lebih dewasa. Pada fase skizon, Plasmodium berukuran kecil, jumlahnya sedikit, memiliki 6-12 merozoit, sitoplasma sulit terlihat, berpigmen padat. Sementara untuk fase gametosit memiliki ciri-ciri: berbentuk bulat, memiliki 1 kromatin yang jelas, pigmen yang kasar dan tersebar merata (umumnya berkumpul di tepi), bentukan pada gametosit yang rusak hanya memiliki pigmen dan kromatin saja (WHO, 1991).

Penampakan pada fase pertumbuhan *Plasmodium knowlesi* stadium trophozoit imatur (*ring form*) identik dengan penampakan pada fase pertumbuhan *Plasmodium falciparum* sedangkan pada fase pertumbuhan matur mirip dengan *P. malariae* (Singh *et al*, 2004).

Berikut adalah tabel dari perbandingan masing-masing bentuk pada fase-fase pertumbuhan Plasmodium.

**Tabel 2.1. Perbandingan morfologi fase-fase perkembangan pada masing-masing spesies Plasmodium (WHO, 1991; Singh *et al*, 2004)**

Spesies Plasmodium	Morfologi pada fase-fase perkembangan eritrositik		
	Tropozoit	Skizon	Gametosit
<i>Plasmodium falciparum</i>			

<p><i>Plasmodium vivax</i></p>			
<p><i>Plasmodium ovale</i></p>			
<p><i>Plasmodium malariae</i></p>			
<p><i>Plasmodium knowlesi</i></p>			

**2.1.4 Patofisiologi Malaria**

Awal mula penularan malaria terjadi ketika nyamuk *Anopheles* betina yang liurnya mengandung sporozoit dari Plasmodium, menggigit manusia untuk menghisap darah manusia. Sporozoit Plasmodium akan berpindah ke jaringan pembuluh darah manusia. Dalam beberapa jam, parasit akan berpindah ke hepar untuk mengalami pematangan dan replikasi sebelum kembali dilepaskan ke aliran darah. Dalam rentang waktu 7-30 hari dari terjadinya gigitan nyamuk, gejala akan

muncul. Gejala yang umumnya terjadi yaitu: demam, sakit kepala, mual, muntah, dan mialgia. Penderita akan sering mengalami gejala setiap 2 atau 3 hari sekali (tergantung jenis Plasmodium yang menginfeksi) bersamaan dengan siklus pada fase eritrosit parasit dalam darah penderita. Reproduksi Plasmodium di manusia melibatkan infeksi di organ hepar dan eritrosit. Ketika sporozoit masuk ke dalam hati, sporozoit akan bereplikasi dan masuk ke dalam aliran darah dalam bentuk merozoit. Merozoit akan menginvasi eritrosit, dimana nanti eritrosit yang terinfeksi tersebut akan difagosit oleh limpa. Fagositosis sel darah terinfeksi berguna untuk mengurangi jumlah parasit namun juga berperan dalam terjadinya anemia dan defisiensi asam folat pada penyakit malaria. Gejala-gejala malaria terutama disebabkan oleh eritrosit yang terinfeksi dan respon inflamasi tubuh. Selain itu organ juga bisa menjadi rusak akibat dari sitoadheren eritrosit terinfeksi *Plasmodium falciparum* pada dinding vaskuler yang kemudian akan mencetuskan terjadinya sekuestran eritrosit terinfeksi yang akhirnya mengakibatkan infark maupun perdarahan pada organ tersebut (Islamuddin, 2010).

### **2.1.5 Diagnosa Malaria**

#### **2.1.5.1 Hapusan Darah**

Diagnosa malaria melalui pemeriksaan hapusan darah dapat ditegakkan dengan ditemukannya bentukan aseksual Plasmodium. Pemeriksaan hapusan darah dapat dilakukan menggunakan teknik hapusan darah tebal dan tipis. Jenis pewarnaan yang umum digunakan adalah pewarna Giemsa dengan pH 7,2. Selain Giemsa, dapat juga digunakan pewarna *Wright*, *Field*, ataupun *Leishman*. Pada proses pembuatan sediaan, hapusan tipis harus segera dikeringkan di udara, difiksasi dengan methanol, dan diberi pewarnaan Giemsa. Sediaan tersebut kemudian diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000 kali menggunakan

minyak imersi. Pada hapusan tipis dapat dihitung derajat parasitemia dari Plasmodium dengan perhitungan jumlah eritrosit yang terinfeksi dibagi dengan 1000 eritrosit, selain itu pada hapusan darah tipis juga dapat terlihat morfologi dari Plasmodium itu sendiri. Sementara pada hapusan darah tebal, sediaan darah harus segera dikeringkan dan segera diberi pewarna tanpa fiksasi terlebih dahulu. Pada hapusan ini, parasit lebih terkonsentrasi dengan ketebalan 40-100 kali dibanding hapusan darah tipis, selain itu pada hapusan darah tebal juga dilakukan penghitungan jumlah Leukosit. Hasil penghitungan total dari tetes tebal adalah jumlah parasit dibagi dengan unit volume. Dengan berasumsi 8000 Leukosit sama dengan 1 *microlyte*, akan diperoleh hasil penghitungan dari parasit per unit volume tersebut (dengan catatan minimal 200 Leukosit harus terlihat pada 1 lapang pandang). Sebelum hapusan darah tebal dikatakan negatif, harus dilakukan pengamatan 100-200 lapang pandang terlebih dahulu. Pada daerah dengan tingkat transmisi malaria tinggi, hasil dengan angka sampai dengan 10.000 parasit per *microlyte* dapat ditoleransi pada pasien yang sistem imunnya kurang baik. Deteksi malaria dengan teknik ini cukup sensitif, namun hanya sebagai identifikasi bahwa malaria adalah penyebab dari penyakit yang diderita pasien. Kurang spesifik untuk mengetahui jenis malaria yang diderita pasien (Fauci *et al*, 2008).

#### **2.1.5.2 Rapid Diagnostic Test (RDT)**

Selain pengamatan menggunakan mikroskop, diagnosis malaria juga dapat ditegakkan dengan metode *Rapid Diagnostic Test* (RDT). Di beberapa daerah, keterbatasan dalam diagnosis dengan pengamatan apusan darah sangat bergantung pada keahlian pengamat, sumber tenaga listrik, dan ketersediaan mikroskop itu sendiri. Hal-hal inilah yang terkadang menjadi penghalang dalam penegakkan diagnosa malaria di beberapa daerah tertentu. Oleh karena hal-hal

tersebut, diperlukan suatu tes alternatif yang lebih memungkinkan untuk dilakukan dengan metode yang lebih mudah dan bisa dilakukan dimana saja tanpa memerlukan peralatan khusus seperti mikroskop, namun karena banyak perusahaan yang memproduksi alat ini, kualitas dari hasil tes menjadi bervariasi tergantung dari kualitas produksi alat RDT ini. Selain itu juga ketahanan alat terhadap suhu dan kelembaban baik saat penggunaan maupun penyimpanan, juga menjadi pertimbangan (WHO, 2011<sup>a</sup>). Prinsip dari teknik diagnosis ini adalah mendeteksi adanya antigen pada Plasmodium yang bereaksi terhadap antibodi *capture* dan *detection* yang terdapat pada membran nitroselulosa alat RDT. Antigen yang paling sering digunakan sebagai target dalam tes ini antara lain adalah: *Histidine-rich protein-2* (HRP-2), *P.falciparum lactate dehydrogenase* (pfLDH), *plasmodium lactate dehydrogenase* (pLDH), dan enzim-enzim aldolase (Murray dan Bennet, 2009).

Antigen HRP-2 merupakan antigen spesifik yang disekresikan oleh *Plasmodium falciparum*. Antigen ini dapat dideteksi sampai hari ke 28 setelah penampakan klinis awal dan juga pada derajat parasitemia yang rendah. Antigen pLDH merupakan suatu enzim akhir pada jalur glikolisis Plasmodium, biasa ditemui pada bentuk seksual dan seksual dan dapat digunakan untuk mendeteksi semua jenis Plasmodium. Antigen pLDH juga dapat digunakan sebagai pembeda antara infeksi *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Aldolase merupakan enzim-enzim kunci pada jalur glikosis Plasmodium dan biasa digunakan sebagai target antigen universal. Aldolase dan pLDH kadarnya turun hingga bisa tidak terdeteksi apabila penderita telah mendapatkan terapi yang efektif. Antigen-antigen lain untuk mengevaluasi *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium knowlesi* belum umum digunakan secara luas (Murray dan Bennet, 2009).

### 2.1.5.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu metode yang lebih sensitif dibandingkan dengan pemeriksaan hapusan darah. Pada studi terdahulu, PCR telah dibuktikan mampu untuk mendeteksi Plasmodium pada 7 spesimen yang dinyatakan negatif dengan pemeriksaan hapusan darah (Johnston *et al* 2006), namun kendala dari tes PCR ini adalah biaya operasional yang tinggi, keterbatasan alat dan waktu yang dibutuhkan lama untuk menginterpretasi hasil. Hal-hal tersebut menjadikan tes ini sulit dilakukan di beberapa daerah negara-negara berkembang yang beberapa adalah negara endemik malaria (Parajuli *et al*, 2009).

Prinsip dari tes *PCR* ini adalah untuk mendeteksi adanya urutan DNA tertentu yang merupakan urutan DNA Plasmodium, pada sampel darah pasien. *Nested PCR* adalah suatu modifikasi dari PCR konvensional, dimana pada reaksi ini akan dilakukan 2 kali amplifikasi DNA. Pertama DNA diekstrak dari sediaan darah kering pada kertas saring menggunakan *QIAamp DNA Mini Kit*, kemudian DNA yang telah diekstrak disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sementara alat dan bahan untuk prosedur berikutnya dipersiapkan. DNA kemudian diamplifikasi pertama kali untuk mengetahui genusnya dengan mencampurkan 10x buffer, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dNTPS, 2.5  $\mu\text{M}$  primer rPLU3 dan rPLU4, 0.4 U Taq DNA Polymerase, dan 1,5  $\mu\text{l}$  sampel DNA. Pada reaksi berikutnya, akan dilakukan amplifikasi untuk mengetahui spesies dari Plasmodium pada sampel. Digunakan 4 tabung masing-masing berisi primer untuk tiap-tiap spesies Plasmodium, pada reaksi kedua ini digunakan 1,5  $\mu\text{l}$  dari hasil reaksi pertama pada konsentrasi dan volume yang sama. Amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut:  $95^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit diikuti dengan 25 (reaksi pertama untuk genus) dan 30 (reaksi kedua untuk spesies) kali siklus *annealing* pada suhu  $58^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit. Kemudian diperpanjang selama 2 menit pada suhu

72°C dan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit. Terakhir reaksi diperpanjang pada suhu 72°C selama 5 menit, dan setelah itu ketika suhu dikurangi menjadi 25°C. Pada saat tersebut proses amplifikasi telah selesai. (Parajuli *et al*, 2009). Hasil amplifikasi kemudian dicampur gel Agarosa dan dianalisa dengan teknik elektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 20 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dapat dilakukan dengan trans-iluminasi sinar UV (Khrisnamurti *et al*, 2012).

### 2.1.6 Resistensi Pengobatan Malaria

Tabel 2.2. Ringkasan dosis dan efek samping obat anti malaria (Diktat Parasitologi FKUB 2011)

Nama Obat	Berkhasiat pada	Dosis	Efek Samping	
			Ringan/sering	Berat
Klorokuin	- Stadium eritrositik <i>P. vivax</i> dan selain <i>P. falciparum</i> - Gametosit selain <i>P. falciparum</i>	25 mg/kg BB minimal selama 2 hari, atau 10 mg/kg BB dilanjut 5 mg/kg BB setelah 6 jam, 24 jam dan 48 jam	Mual, muntah, sakit kepala, sulit akomodasi, gatal-gatal, leukopeni	Rambut rontok, Retinopati, Agranulositosis
Kuinin/kina	- Stadium eritrositik <i>P. falciparum</i> dan semua jenis Plasmodium - Gametosit selain <i>P. falciparum</i>	10 mg/kg BB selama 7 hari (ditambah tetrasiklin 250mg. 4 kali selama 7 hari	Tinnitus, pendengaran berkurang, penglihatan kabur	Gatal-gatal, serangan asma, buta
Primakuin	- Bentuk Preeritrositik - Bentuk hipnozoit - Gametosit semua jenis Plasmodium	- 15 mg selama 14 hari - Gametosit <i>P. falciparum</i> : 30-45 mg dosis tunggal setiap minggu (8 minggu)	Anoreksia, mual, muntah, nyeri perut	Leukopenia, anemia, Methemoglobine mia, Hemolisis (pada defisiensi G6PD)
Sulfadoksin primetamin	- Skizontisida dengan kerja lambat untuk semua	1500 mg sulfa + 75 mg pirimetamin (=3 tablet) sekaligus	Mual, muntah, kejang perut, tremor	Ruam kulit, sindrom Steven Johnson, Trombositopeni, Agranulositosis

	spesies - Sporontia - sida			
Meflokuin	- Bentuk aseksual untuk semua spesies - Gametosit semua spesies kecuali <i>P. falciparum</i>	15 mg/kg BB atau 750 mg dosis tunggal	Mual, muntah, nyeri perut, nafsu makan menurun, diare	Bradikardia, rambut rontok, gangguan psikiatrik
Tetrasiklin	Sebagai kombinasi terapi dengan Kuinin	4 x 250 mg selama 7-14 hari	Mual, muntah, gastritis	Hepatitis, Gigi cokelat
Artemisin	- Bentuk aseksual <i>P. falciparum</i> yang resisten terhadap obat lain - Tidak untuk hipnozoit dan gametosit	(lihat uraian obat antimalaria)	Hampir tidak ada	Bradikardia, Retikulositosis, Neutrofilia, Eosinofilia, Rekrudesensi

Sebanyak 40% negara-negara endemik malaria telah mengalami penurunan kasus malaria lebih dari 50% total kasus dalam beberapa tahun terakhir (WHO, 2011) namun dengan adanya kasus resistensi pada obat anti malaria, keberhasilan tersebut tidak akan bertahan lama. Resistensi telah menjadi hal biasa yang selalu terjadi dalam pengobatan malaria dan selalu menjadi hambatan terbesar dalam upaya penurunan jumlah kasus malaria. Hingga saat ini 3 dari 5 spesies Plasmodium yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, dan *Plasmodium malariae* diketahui sudah mengalami resistensi terhadap sebagian besar obat anti malaria. Kemudian juga terjadi resistensi silang antara obat dengan mekanisme kerja sama yang semakin mempersulit penanganan malaria (WHO, 2010).

Resistensi terjadi karena paparan obat anti malaria dalam konsentrasi rendah pada Plasmodium. Hal ini bisa dikarenakan berbagai hal seperti contoh kepatuhan pasien dalam terapi dan juga pasien yang beberapa kali memuntahkan obat anti

malarianya. Plasmodium yang resisten tersebut kemudian ditransmisikan oleh nyamuk *Anopheles* ke manusia lain (WHO, 2010). Contoh pengobatan malaria yang telah mengalami resistensi di berbagai belahan dunia adalah Klorokuin, Kuinin, Sulfadoksin-pirimetamin, Meflokuin, Primakuin dan juga telah tercatat resistensi terhadap Artemisinin (baik monoterapi maupun kombinasi) yang merupakan obat anti malaria paling ampuh yang ada saat ini. Di Indonesia sendiri telah ditemukan 4 kasus kegagalan pengobatan malaria menggunakan kombinasi artesunate-amodiaquine (WHO, 2010).

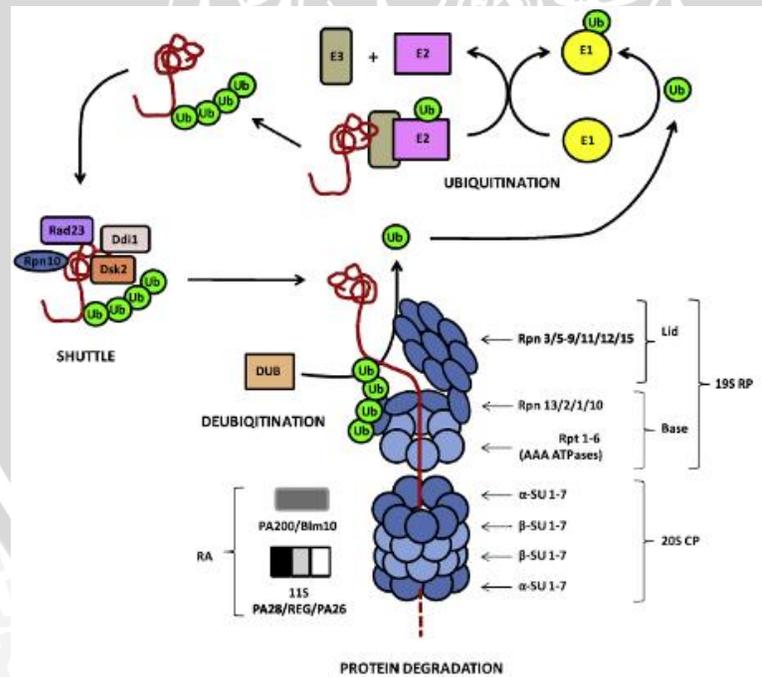
## 2.2 **Ubiquitin dan Jalur Proteolitik Proteasom**

Sistem *Ubiquitin*/proteasom (UPS) adalah jalur utama pada sitosol dan nukleus sel eukariot yang berfungsi mendegradasi secara selektif protein seluler. Sistem *Ubiquitin*/proteasom ini berperan dalam berbagai aktivitas sel yang membutuhkan degradasi protein seperti pada siklus sel, transkripsi, respon imun, dan kontrol kualitas produksi protein *de novo*. Oleh karena perannya tersebut, sistem *Ubiquitin*/proteasom bertanggung jawab terhadap kontrol kualitas protein seluler, proliferasi sel, kematian sel dan transduksi sinyal sel (Kreidenweiss *et al*, 2008). Sistem *Ubiquitin*/proteasom ini terutama berperan pada sel yang cepat membelah, yang pertumbuhan dan transkripsi selnya berlangsung dalam waktu singkat (Delcros *et al*, 2003)

*Plasmodium falciparum* memiliki beberapa karakteristik sebagai berikut: i) fase eritrosit parasit memiliki kecepatan replikasi yang tinggi, ii) ukuran protein *Plasmodium falciparum* yang besar, iii) regio dengan kompleksitas rendah adalah *abundant* di antara dan di dalam domain globular, dan iv) protein mengalami stres karena meningkatnya temperatur penderita saat demam. Berdasarkan karakteristik

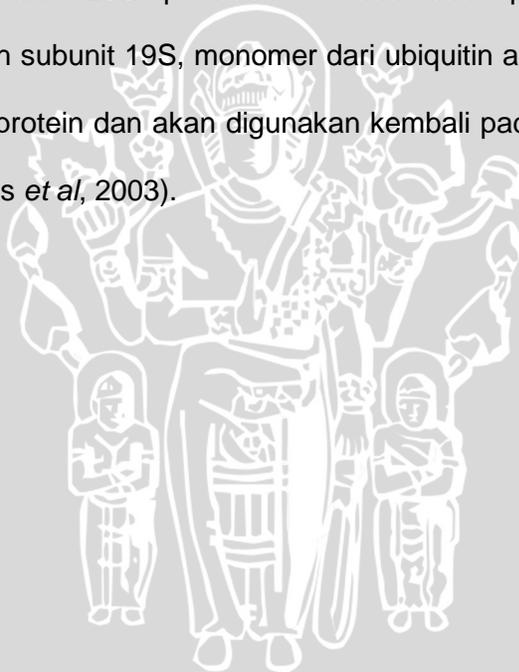
tersebut, sangat dibutuhkan suatu sistem kontrol kualitas protein yang baik bagi keberlangsungan hidup *Plasmodium falciparum* itu sehingga peranan sistem Ubiquitin/proteasom menjadi sangat penting. (Kreidenweiss *et al*, 2008).

Proteasom adalah intrasellular non-lisosomal *multicatalytic complex* yang mendegradasi protein yang berikatan dengan rantai *poliubiquitin* sebagai marker protein tersebut. Proteasom merupakan suatu struktur makromolekul yang terdiri dari lebih dari 33 subunit, yang membentuk proteolitik barrel dimana subunit 20S berperan sebagai *core particle* (CP) dan dihubungkan dengan 1 atau 2 subunit 19S yang merupakan *regulator particle* (RP). Subunit 19S berperan mengenali protein yang berikatan dengan rantai *poliubiquitin*, membuka rantai tersebut serta membuka substrat untuk kemudian ditranslokasikan ke dalam subunit 20S untuk didegradasi (Aminake *et al*, 2012).



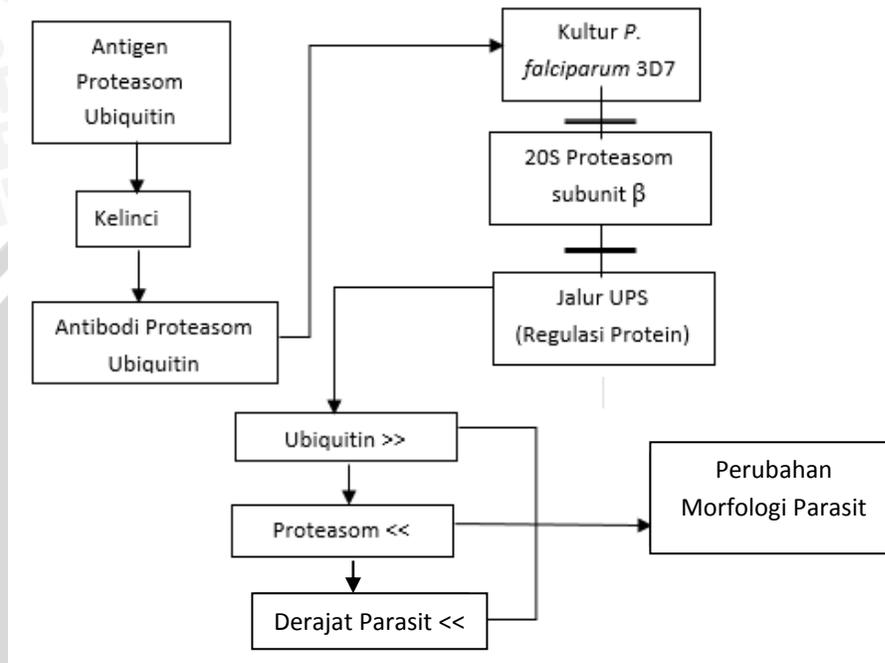
Gambar 2.3 Sistem Ubiquitin/Proteasom (Aminake *et al*, 2012)

Pada proses degradasi protein melalui jalur *Ubiquitin*/proteasom, pertama-tama protein dikenali oleh subunit 19S dari proteasom. Untuk proses pengenalan tersebut, diperlukan suatu mekanisme *signaling* khusus. Mekanisme *signaling* ini diperankan oleh polyubiquitin. Penambahan rantai polyubiquitin pada protein bergantung pada 3 jenis enzim berbeda dengan fungsi spesifik tersendiri. Enzim E1 berfungsi untuk mengaktivasi ubiquitin, enzim E2 sebagai *carrier* dari ubiquitin, dan enzim E3 sebagai pengikat antara ubiquitin dengan protein tersebut. Kemudian protein tersebut akan dikenali oleh subunit 19S proteasom dan memulai proses degradasinya oleh subunit 20S proteasom. Pada saat protein yang diikat *poliubiquitin* dikenali oleh subunit 19S, monomer dari ubiquitin akan melepaskan diri dari ikatan *poliubiquitin*-protein dan akan digunakan kembali pada proses degradasi protein yang lain (Delcros *et al*, 2003).



BAB 3  
KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



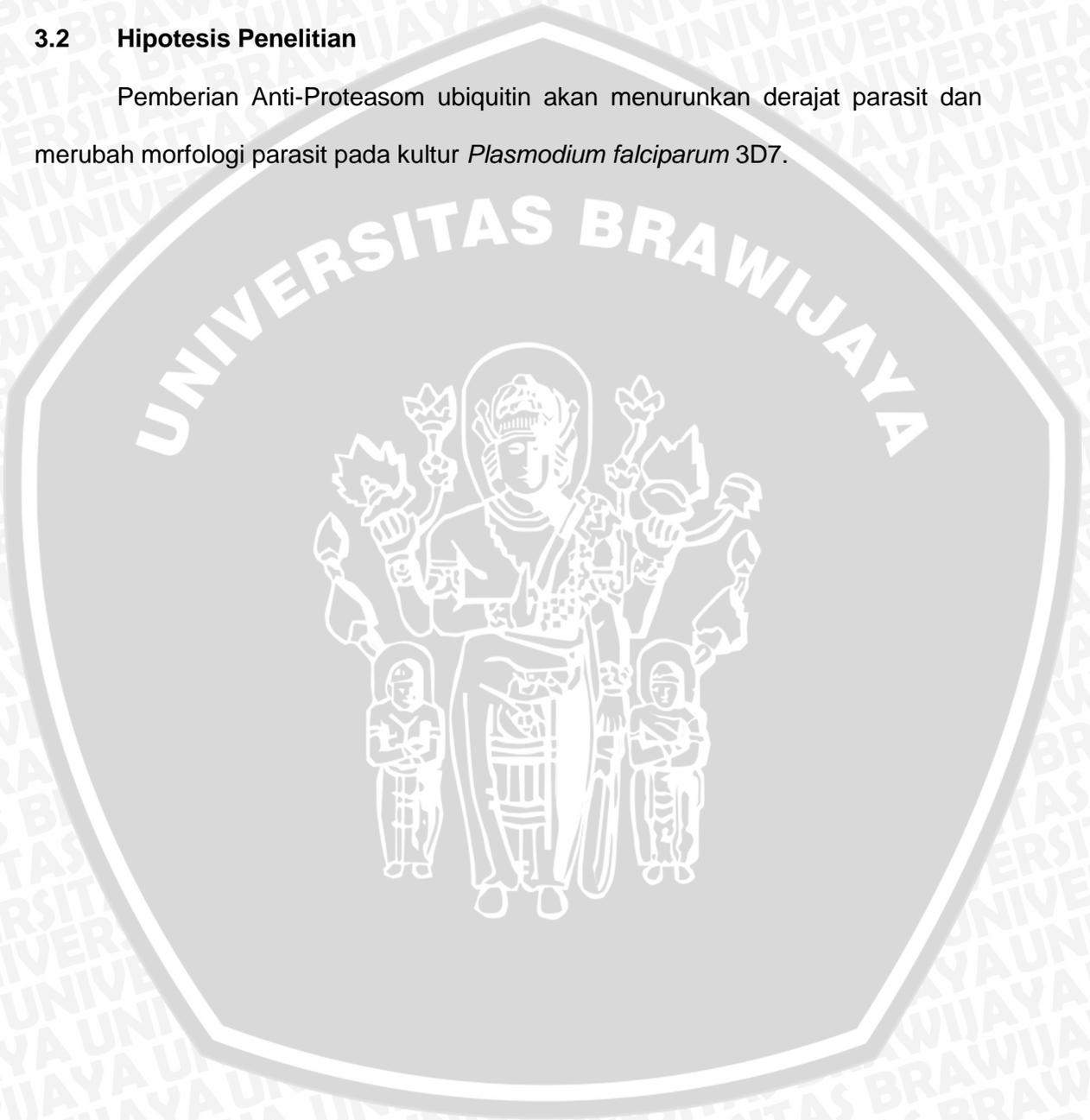
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Antigen Proteasom *ubiquitin* akan diinjeksikan kepada kelinci, lalu kemudian kelinci menghasilkan antibodi terhadap antigen Proteasom *ubiquitin* tersebut yang kemudian akan diisolasi untuk diaplikasikan pada kultur *Plasmodium falciparum* 3D7. Antibodi ini dikhususkan untuk menghambat aktivitas Proteasom 20S subunit  $\beta$  yang kemudian akan menghambat proses regulasi protein dalam sel. Akan terjadi peningkatan dari kadar protein tidak terdegradasi yang ditandai dengan meningkatnya jumlah ubiquitin, menurunnya jumlah proteasom, dan menurunnya derajat parasitemia. Akibat dari meningkatnya kadar protein yang sudah tidak berguna tersebut, sel eritrosit yang terinfeksi akan menjadi lisis dan morfologi dari

Plasmodium tersebut mengalami kerusakan yang ditandai dengan munculnya *crisis form* pada apusan darah hasil kultur Plasmodium.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian Anti-Proteasom ubiquitin akan menurunkan derajat parasit dan merubah morfologi parasit pada kultur *Plasmodium falciparum* 3D7.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan metode yang digunakan yaitu *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Penelitian dilakukan pada kultur *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*.

### 4.2 Populasi dan Sampel

Kultur *Plasmodium falciparum* galur 3D7 yang didapat dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dibagi dalam beberapa kelompok sebagai berikut :

- a. Kelompok KP : Kelompok kontrol positif (kultur *P. Falciparum* 3D7 tanpa diberi perlakuan apapun)
- b. Kelompok A : Kelompok perlakuan A (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi Antibodi Proteasom dosis 100µg/mL)
- c. Kelompok B : Kelompok perlakuan B (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi Antibodi Proteasom dosis 200µg/mL)
- d. Kelompok C : Kelompok perlakuan C (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi Antibodi Proteasom dosis 300µg/mL)
- e. Kelompok D : Kelompok perlakuan D (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi antibodi kelinci kontrol yang diinjeksi TrisHCL dan Adjuvan)
- f. Kelompok KN : Kelompok kontrol negatif (kultur eritrosit normal).

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam waktu empat bulan, dari bulan Mei sampai dengan bulan Agustus 2013.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis Antibodi proteasom dengan 3 dosis berbeda

#### 4.4.2 Variabel Terikat Penelitian

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah derajat parasit dan morfologi parasit.

### 4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Kultur *Plasmodium falciparum* yang digunakan adalah kultur *Plasmodium falciparum* 3D7, merupakan *Plasmodium falciparum* yang sensitif terhadap klorokuin dan dibiakkan menurut Trager Jensen (Ljungstorm *et al*, 2004).
2. Antigen proteasom merupakan Antigen Proteasom sel eukaryotik dari 20S *Proteasome Assay Kit*, katalog *item* no. 10008041 yang diperoleh dari *Cayman Chemical Company*.

3. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA): *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik FKUB
4. *Antibodi Proteasom*: merupakan hasil pengambilan Antibodi poliklonal spesifik dari induksi *Antigen proteasom* pada kelinci.
5. Jumlah parasit adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* 3D7 pada semua stadium dalam 1000 eritrosit menggunakan penghitungan parasit pada pengecatan Giemsa.
6. Perubahan morfologi parasit adalah perubahan dari semua stadium parasit menjadi bentuk *crisis form* dilakukan pada sediaan hapusan darah menggunakan mikroskop di Laboratorium Biomedik FKUB.

#### 4.6 **Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian**

##### 4.6.1 **Bahan dan Alat Pembuatan Antibodi**

###### 4.6.1.1 **Alat dan Bahan Inokulasi Protein Proteasom ke Kelinci**

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah spuit insulin 1 ml, PBS, *Complete Freund's Adjuvant* dan *Incomplete Freund's Adjuvant*.

###### 4.6.1.2 **Alat dan Bahan Identifikasi Antibodi Proteasom Kelinci dengan dot blot**

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah: antigen Proteasome, Assay Buffer 10 $\mu$ L, Membran nitroselulosa, *Bio-Dot Apparatus Bio-Rad*, TBS-Skim Milk 5%, TBS-Tween 0,05%, antibodi primer (antibodi proteasome yang telah di-SAS dan di encerkan dalam *Tris Buffer Saline* (TBS)

dengan perbandingan 50:500 (v/v)), antibodi sekunder (*Anti-rabbit Alkaline Phosphatase conjugate*), *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate – Nitro Blue Tetrazolium (BCIP-NBT) Substrate*, aquades.

#### 4.6.2 Alat dan Bahan Kultur *Plasmodium falciparum*

Bahan yang digunakan adalah Medium minus, Larutan *sodium bicarbonate* 5%, medium komplet, medium plus, PBS. Alat yang digunakan *vertical laminar airflow*, inkubator CO<sub>2</sub>, sentrifus biasa, botol biakan (*culture flask*) 25 ml, *24 well culture*, membran filter 0,2 µm, pipet 2 ml dan 5 ml, *Laboratory bottle* 100 ml, *sprit* 2,5 ml dan 10 ml, kaca objek, *Nitrogen liquid tank* (Ljungstorm et al, 2004).

#### 4.6.3 Alat dan Bahan *Thawing* Kultur *Plasmodium falciparum*

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

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Pengecatan Giemsa

Alat dan bahan yang diperlukan adalah gelas obyek, gunting steril, mikroskop, pipet, kapas alkohol, minyak emersi. *Methanol* absolut (Merck), Giemsa (Sigma), buffer Giemsa.

#### 4.6.5 Alat dan bahan untuk Sanitasi dan Higienisasi

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

### 4.7 Metode Pengumpulan Data dan Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Metode Pengumpulan Data

Data yang diambil berupa data parasitemia dan morfologi parasit.

## 4.7.2 Prosedur Penelitian

### 4.7.2.1 Inokulasi Proteasome pada Kelinci

Kelinci yang digunakan dalam penelitian ini untuk produksi antibodi adalah kelinci berwarna putih, jantan, sehat, lincah dan berusia 4-6 bulan. Protein Proteasom yang telah diisolasi dilarutkan PBS sebanyak 1000µg/ml dan dicampurkan dalam suspensi cair dengan CFA dengan perbandingan 1:1 menggunakan vortex. Protein dan CFA diinjeksikan subkutan pada penyuntikan pertama kali dan pada saat *booster* dilanjutkan dengan pemberian Proteasom dan IFA diinjeksi subkutan. Pemberian Protein dan Adjuvan dilakukan selama 8 minggu dengan selang waktu 2 minggu antara suntikan pertama dengan *booster* 1 dan 2 minggu antara *booster* 1 dengan *booster* 2 (*Primm, Guide Polyclonal Antibodies Against Antigen supplied by customer*).

### 4.7.2.2 Identifikasi Antibodi Proteasom Kelinci dengan *dot blot*

Mengencerkan antigen Proteasome pada Assay Buffer proteasome dengan perbandingan (0,5:2,5); (0,25:2,5); dan (0,124:2,5) sebanyak 10µL. Membran nitroselulosa dirangkai pada alat Bio-Dot Apparatus Bio-Rad. Masukkan protein yang telah diencerkan dalam sumuran 50µL, dibiarkan *overnight*. Blocking dengan TBS-Skim Milk 5% *overnight* pada suhu ruang. Dicuci dengan TBS-Tween 0,05% (3x3 menit) goyang pelan, kemudian diinkubasi dalam antibodi primer (antibodi proteasome yang telah di-SAS dan diencerkan dalam TBS dengan perbandingan 50:500 (v/v)) selama 2 jam pada suhu ruang, cuci dengan TBS-Tween 0,05% (3x3 menit) goyang pelan, kemudian inkubasi dalam antibodi sekunder (*Anti-rabbit Alkaline Phosphatase conjugate*) selama 1 jam suhu ruang.

dicuci dengan TBS-Tween 0,05% (3x3 menit), dan diinkubasi dalam BCIP-NBT Substrate selama 15 menit dalam ruang gelap, kemudian diberi aquades dan dikeringkan.

#### **4.7.2.3 Thawing dan Kultur *Plasmodium falciparum***

##### **4.7.2.3.1 Preparasi Serum Manusia**

Darah vena dari donor golongan darah O dikoleksi ke dalam 50 ml tabung steril menggunakan kit transfusi tanpa anti-koagulan (lima tabung). Dibiarkan selama 24 jam (*overnight*) pada suhu 4°C. Darah disentrifus pada 3500 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar. Serum dikoleksi dan disterilkan dengan melewati filter 0,2 µm. Inaktivasi serum pada suhu 56°C selama 60 menit. Dapat disimpan pada -20°C dalam *deep freezer*. Pada waktu akan digunakan dilakukan pencairan dengan suhu 37°C dalam *waterbath* (Ljungstrom *et al*, 2004).

##### **4.7.2.3.2 Preparasi Eritrosit Segar (*Red Blood Cells 50%*)**

Tujuh ml darah segar (*whole blood*) golongan O ditransfer ke dalam tabung 15 ml. Darah ditambah medium M (+) dengan volume yang sama dan disentrifus 2000 rpm selama 5 menit pada suhu ruangan. Semua *buffy coat* dibuang dan endapan diresuspensi dalam Medium (+) sebanyak-banyaknya. Selanjutnya disentrifus 2000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar. Supernatan dibuang dan diresuspensikan kembali dengan medium M (+) kemudian larutan disentrifus 2000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar. Sedimen darah dikoleksi dan terakhir ditambahkan Medium Komplit 5%, sehingga didapatkan *Red*

*Blood Cells*(RBC) 50 %. Stok RBC disimpan pada 4° C, dapat digunakan sampai 1 minggu (Ljungstrom *et al*, 2004).

#### **4.7.2.3.3 Kultur Isolat *Plasmodium falciparum* galur 3D7**

Isolat *P.falciparum* galur 3D7 ditumbuhkan dalam medium RPMI-1640 yang mengandung 10% serum manusia tipe O (Medium komplit 10%) dan 5% hematokrit dengan metode Trager and Jensen (1976) (Ljungstrom *et al*, 2004).

#### **4.7.2.3.4 Sub-Kultur *Plasmodium falciparum***

Jika kultur parasit belum mencapai derajat parasit 5% maka assay belum dapat dilakukan dan perlu dilakukan sub- kultur dengan cara sebagai berikut: Suspensi kultur disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang dan resuspensi endapan dengan medium komplit 10 % dengan volume yang sama untuk membuat suspensi 50%. Bagi suspensi dalam botol yang baru dan ditambahkan sediaan eritrosit segar untuk membuat parasitemia 0,5 – 1 %. Terakhir ditambahkan medium komplit 10% untuk mendapatkan hematokrit sebesar 5 – 10 %.

#### **4.7.2.3.5 Freezing *Plasmodium falciparum***

Suspensi biakan yang mengandung eritrosit terinfeksi parasit stadium cincin lebih besar dari 10% disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan diresuspensi dengan larutan *freezing* sama banyak. Suspensi diletakkan dalam *small screw cap vials* dan segera masukkan pada freezer -20°C, -50°C, -70°C dan terakhir dalam larutan Nitrogen cair.

#### 4.7.2.3.6 *Thawing Plasmodium falciparum* galur 3D7

Larutan *thawing* dihangatkan pada *waterbath* 37°C. Isolat parasit diambil dari *liquid Nitrogen tank* dan diletakkan pada *Laminar air flow*. Isolat ditransfer pada tabung sentrifus 15 ml. Pada suspensi parasit ditambahkan larutan NaCl 12% dalam PBS sebanyak 1/5 volume suspensi parasit tetes demi tetes, dibiarkan 5 menit. Ditambahkan larutan NaCl 1,6% dalam PBS pada suspensi parasit sebanyak 9 kali volume suspensi parasit tetes demi tetes dan kemudian dicampur secara perlahan. Suspensi disentrifus pada 2000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan pada endapan ditambahkan larutan 0,9% NaCl dalam PBS dan 0,2% glukosa sebanyak 9 kali volume endapan, tetes demi tetes dan kemudian dicampur secara perlahan. Suspensi disentrifus 2000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Endapan diresuspensikan dengan medium komplit 15% sebanyak 10 ml dan ditransfer pada botol kultur (Ljungstrom *et al*, 2004).

#### 4.7.2.4 Paparan Antibodi pada Kultur Eritrosit terinfeksi *Plasmodium falciparum* 3D7

Antibodi dilarutkan dalam PBS pada 100 µg/mL, kemudian ditambah 0,4 µL reagen Ab-DeliverIN pada satu mikrotube hingga volume larutan 20µL, dan total volume medium 120 µL. Lalu ditambahkan 4 µL antibodi (100 µg/L ke reagen Ab-DeliverIN, lalu campurkan menggunakan pipet. Setelah diinkubasi 10-15 menit pada suhu ruang, ditambahkan lagi 20 µL medium serum-free ke campuran antibodi-Ab-DeliverIN, dipisahkan ke sel kultur pada medium kultur regular (dengan serum). Terakhir diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> kondisi standart. Antibodi

proteasom dan Ab-DeliverIN yang telah dicampurkan, digunakan sesuai dosis pada 24-well plate. Dengan paparan antibodi selama 48 jam dan diamati setiap 12 jam.

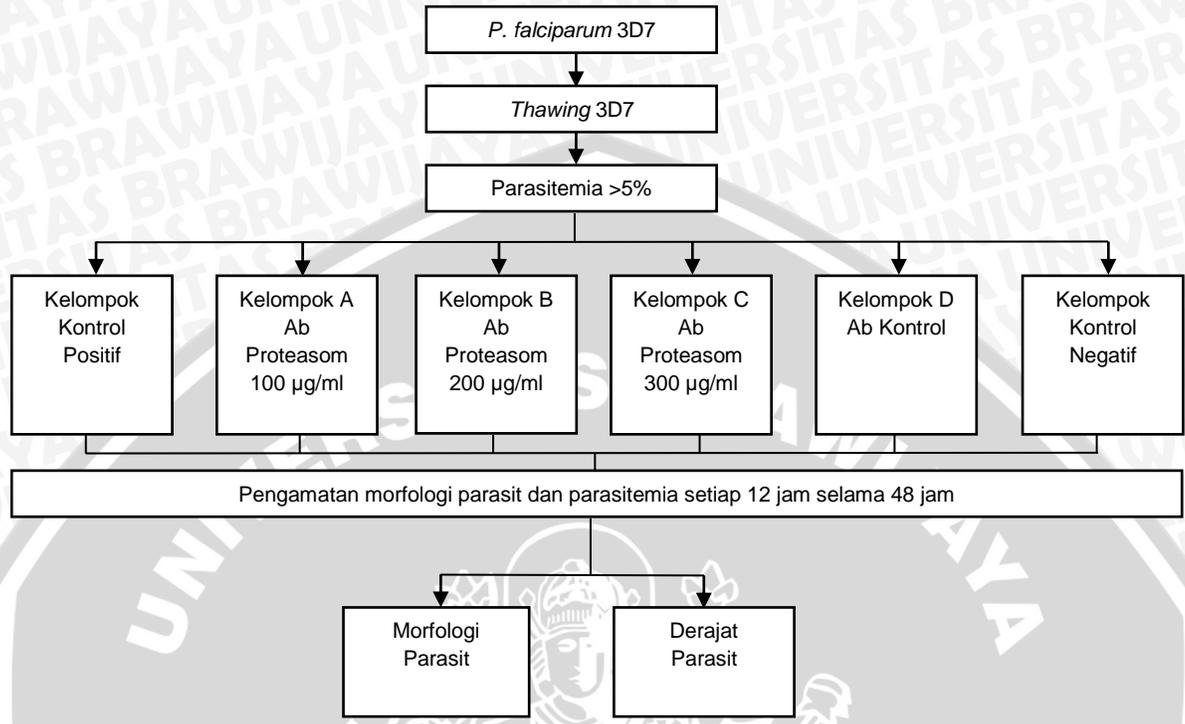
#### 4.7.2.5 Pemeriksaan Morfologi dan Derajat Parasit

Kultur terinfeksi diambil dan dibuat hapusan pada gelas objek, ditunggu hingga kering dan diberi methanol hingga merata dan ditunggu kering. Hapusan dicat dengan giemsa yang merupakan campuran pulas giemsa dan buffer giemsa dengan rasio 1:4 selama 20 menit. Kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Derajat dan morfologi parasit dilihat pada pembesaran 1000 x. Persentase parasit dihitung berdasarkan jumlah eritrosit terinfeksi malaria setiap 1000 eritrosit.

#### 4.8 Pengolahan Data

Analisis data yang dilakukan dengan SPSS 16, berupa uji normalitas, uji homogenitas, dan oneway ANOVA dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$ .

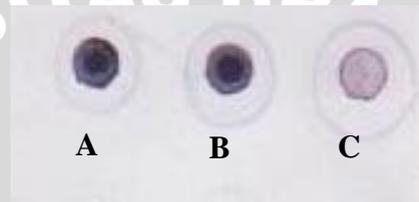
#### 4.9 Alur penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

**BAB 5****HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1 Identifikasi Antibodi Proteasom Kelinci dengan *dot blot***

Sampel yang digunakan adalah sampel Antigen Proteasom dengan Proteasom assay buffer sebagai pengencer (Ag-Proteasom : Assay Buffer). A (0,5 : 2,5); B (0,25 : 2,5); C (0,125 : 2,5) dengan hasil identifikasi sebagai berikut:



**Gambar 5.1 Identifikasi Antibodi Proteasom Kelinci dengan *dot blot***

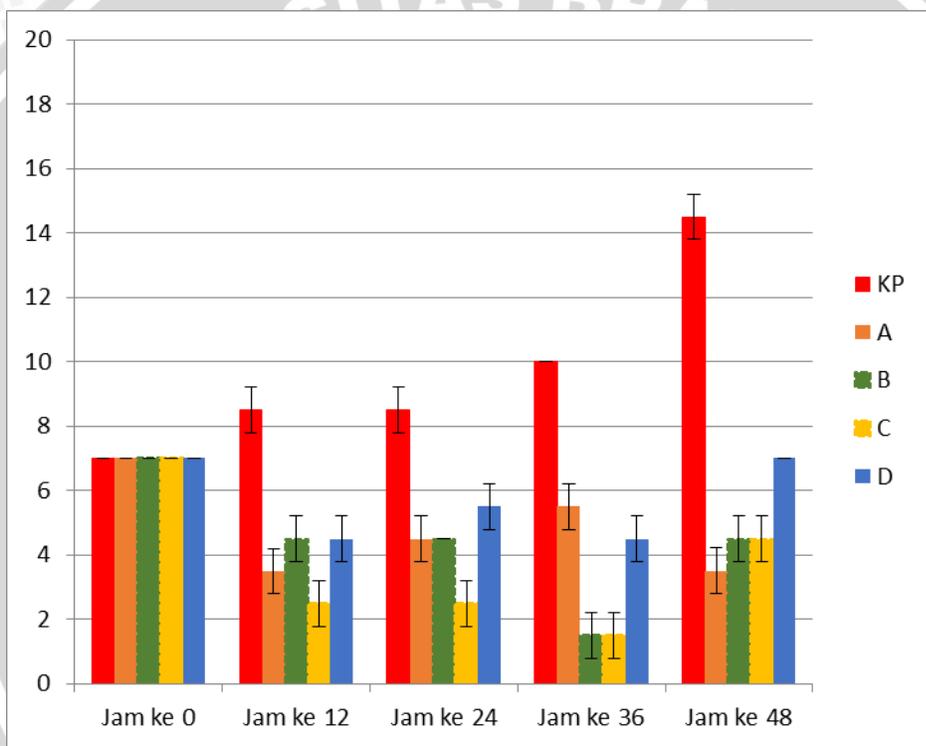
Hasil identifikasi Antibodi Proteasom menggunakan *dot blot* tersebut menunjukkan terbentuknya Antibodi Proteasom pada kelinci yang digunakan dalam memproduksi Antibodi. Pada A dan B didapatkan hasil ikatan Antigen Proteasom dengan Antibodi Proteasom yang diproduksi sama baik, yang ditandai dengan penampakan yang sama tebal. Sementara pada C tampak lebih pudar oleh karena kadar antigen Proteasom yang lebih rendah namun tetap ada ikatan antara Antigen dan Antibodi Proteasom.

**5.2 Perhitungan Derajat Parasit**

Perhitungan derajat parasit dilakukan setelah masing-masing kelompok mendapatkan perlakuan sesuai dengan perlakuan masing-masing setiap 12 jam sekali selama 48 jam pengamatan. Hasil dari perhitungannya adalah sebagai berikut:

**Tabel 5.1 Derajat Parasit Kelompok Kontrol dan Kelompok yang Diimunisasi**

Kelompok	Derajat Parasitemia (%) ( $\bar{x} \pm SD$ )				
	Jam ke 0	Jam ke 12	Jam ke 24	Jam ke 36	Jam ke 48
Kontrol +	7,00± 0,00	8,50± 0,71	8,50± 0,71	10,00± 0,00	14,50± 0,71
A	7,00± 0,00	3,50± 0,71	4,50± 0,71	5,50± 0,71	3,50± 0,71
B	7,00± 0,00	4,50± 0,71	4,50± 0,00	1,50± 0,71	4,50± 0,71
C	7,00± 0,00	2,50± 0,71	2,50± 0,71	1,50± 0,71	4,50± 0,71
D	7,00± 0,00	4,50± 0,71	5,50± 0,71	4,50± 0,71	7,00± 0,00



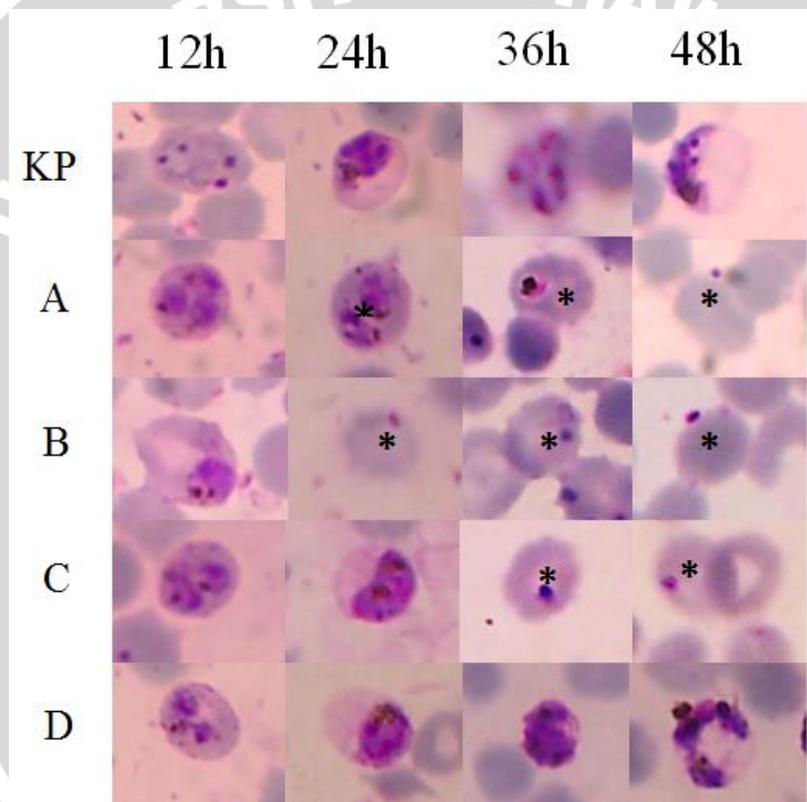
**Gambar 5.2 Grafik Derajat Parasit Kelompok Kontrol dan Kelompok yang Diimunisasi.** KP: Kontrol Positif ; A: Kelompok perlakuan Ab Proteasom 100 µg/ml ; B: Kelompok perlakuan Ab Proteasom dosis 200 µg/ml ; C: Kelompok perlakuan Ab Proteasom dosis 300 µg/ml ; D: Kelompok perlakuan Ab kontrol

Hasil perhitungan menunjukkan adanya perbedaan yang berarti antara derajat parasit kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif (+) pada setiap

12 jam pengamatan. Pada uji *one way anova* didapatkan hasil signifikansi  $p < 0,05$  yang berarti ada perbedaan yang signifikan paling tidak antara 2 kelompok kontrol.

### 5.3 Pengamatan Morfologi Parasit

Seperti pada perhitungan derajat parasit, pengamatan morfologi parasit dilakukan pada mikroskop dengan rentang waktu setiap 12 jam selama 48 jam setelah perlakuan pada masing-masing kelompok perlakuan. Hasil dari pengamatan tersebut adalah sebagai berikut:



**Gambar 5.3 Pengamatan Morfologi Parasit.** Tanda bintang (\*) menandakan adanya bentuk *crisis form*. KP: Kontrol Positif ; A: Kelompok perlakuan Ab Proteasom 100 µg/ml ; B: Kelompok perlakuan Ab Proteasom dosis 200 µg/ml ; C: Kelompok perlakuan Ab Proteasom dosis 300 µg/ml ; D: Kelompok perlakuan Ab kontrol

Penampakan mikroskopik parasit kelompok perlakuan pada setiap 12 jam penampakan menunjukkan perbedaan dengan kelompok kontrol positif (KP). Pada kelompok perlakuan A, B, dan C terdapat tanda-tanda kerusakan parasit dalam

bentuk *crisis form* yang menunjukkan terjadinya hambatan dalam pertumbuhan parasit yang akan menyebabkan parasit menjadi stress dan mati. *Crisis form* tersebut ditunjukkan dengan sitoplasma yang rusak dan inti parasit yang bergeser ke tepi.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Hasil Analisis Identifikasi Antibodi Proteasom Kelinci dengan *dot blot*

Antibodi yang diproduksi dalam penelitian ini merupakan antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal adalah antibodi yang terbentuk dari proses imunisasi yang dilakukan secara sengaja terhadap hewan percobaan dengan suatu imunogen spesifik (Setyaningsih, 2011). Kekurangan dari antibodi poliklonal adalah adanya kemungkinan antibodi tersebut untuk dapat mengenali lebih dari 1 macam epitop sehingga reaksi kekebalan yang dihasilkan menjadi kurang spesifik dan dapat terjadi reaksi silang. Sementara kelebihan dari antibodi poliklonal dibanding antibodi monoklonal adalah antibodi poliklonal dapat diproduksi dalam jumlah banyak, tidak memakan waktu, membutuhkan biaya produksi yang lebih murah, dan prosedur pelaksanaan yang lebih sederhana. Dalam produksi antibodi monoklonal diperlukan waktu hingga bertahun-tahun karena lamanya waktu yang diperlukan untuk imunisasi dan pembiakan hibridoma yang diperlukan dalam proses produksinya (Lipman *et al*, 2005). Oleh karena pertimbangan tersebut, dalam penelitian ini digunakanlah antibodi poliklonal sebagai terapi pada kultur *Plasmodium falciparum* 3D7. Agar didapatkan hasil produksi antibodi yang optimal diperlukan suatu peningkatan dalam reaksi sistem kekebalan sel-sel inang. Untuk meningkatkan reaksi sel dari sistem kekebalan sel inang perlu digunakan adjuvan. Adjuvan mempengaruhi sistem kekebalan inang melalui beberapa proses, seperti menarik sel-sel makrofag menuju lokasi penyuntikan, meningkatkan sirkulasi limfosit, memodifikasi membran sel, dan merangsang aktivitas sel-sel lain yang terlibat dalam rangkaian respon kekebalan (Setyaningsih, 2011). Adjuvan yang digunakan dalam

penelitian ini adalah *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) untuk paparan pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) untuk paparan kedua. CFA merupakan adjuvan yang sangat kuat karena adanya kandungan muramil dipeptida yang merupakan bagian aktif dari mikobakteri yang berfungsi untuk merangsang fungsi makrofag dan merangsang respon antibodi dalam waktu lama. CFA memiliki peran khusus untuk merangsang fungsi sel T dan meningkatkan produksi Ig G (Tizard, 2004) Sementara IFA adalah suatu minyak mineral tanpa adanya kandungan mikobakteri yang berfungsi sebagai peningkat reaksi sistem kekebalan tubuh yang juga memiliki fungsi untuk mencegah reaksi hipersensitifitas dari sistem kekebalan sel inang (Setyaningsih, 2011)..

Antibodi Proteasom yang telah diproduksi tersebut dianalisis secara semi kuantitatif melalui metode *dot blot*. *Dot blot* merupakan suatu teknik untuk mendeteksi, menganalisis, dan mengidentifikasi protein yang cepat dan sederhana. *Dot blot* memiliki kemiripan dengan *Western blot*. Namun pada *Dot blot* tidak dilakukan separasi sampel protein dengan elektroforesis seperti yang dilakukan pada metode *Western blot*. Pada *Dot blot* protein yang teridentifikasi akan terlihat dalam bentukan titik-titik bulat apabila berikatan dengan Antibodi spesifiknya. Dalam penelitian ini analisis *dot blot* menggunakan 3 sampel, sampel yang pertama adalah sampel A yang merupakan kombinasi antara Antigen Proteasom dengan Proteasom *assay buffer* sebagai pengencer dengan perbandingan 0,5 : 2,5. Kemudian yang kedua adalah sampel B dengan perbandingan kombinasi Antigen Proteasom dengan Proteasom *assay buffer* 0,25 : 2,5. Lalu sampel terakhir adalah sampel C dengan perbandingan kombinasi Antigen Proteasom dengan Proteasom *assay buffer* 0,125 : 2,5. Pembagian sampel untuk analisis ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan kekuatan ikatan Antigen Proteasom dengan Antibodi

Proteasom yang terbentuk dari masing-masing konsentrasi Antigen-Proteasom. Analisis ini menggunakan Antibodi kelinci yang telah di-SAS dan diencerkan dalam *Tris Buffer Saline* dengan perbandingan 50 : 500 sebagai Antibodi primer dan *Anti-rabbit Alkaline Phospatase conjugate* sebagai antibodi sekunder. Dari hasil analisis ini terdapat bentukan titik hitam pada sampel A, B dan C. Dengan sampel A dan B memiliki tingkat ketebalan yang identik dan C memiliki ketebalan yang lebih rendah dibanding sampel A dan B. Pada sampel A dan B ikatan Antigen dengan Antibodi yang dihasilkan sama kuat dan pada sampel C ikatan yang dihasilkan lebih lemah. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa benar ada Antibodi yang secara spesifik bekerja terhadap Antigen Proteasom dari Antibodi kelinci yang digunakan sebagai Antibodi primer meskipun pada sampel C ikatan yang dihasilkan lebih lemah.

## 6.2 Hasil Analisis Perhitungan Derajat Parasit

Perhitungan derajat parasit merupakan suatu metode yang dapat menentukan tingkat keparahan dari suatu penyakit malaria agar kemudian dapat ditentukan langkah-langkah pengobatan yang sesuai dengan tingkat keparahan tersebut. Perhitungan ini dilakukan dengan cara membuat hapusan darah tipis yang diberi pewarnaan giemsa lalu kemudian dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* dari minimal 1000 eritrosit pada beberapa lapang pandang. Bentukan gametosit merupakan bentukan ekstraeritrositik dari *Plasmodium* sehingga tidak dapat dimasukkan ke dalam perhitungan derajat parasit (Bailey *et al*, 2013). Pada penelitian ini derajat parasit setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dihitung setiap 12 jam sekali. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa derajat parasit pada kelompok kontrol positif memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada jam ke 12, 24, 36 dan 48 setelah terapi, yang berarti

bahwa ada suatu efek penghambatan terhadap pertumbuhan parasit yang dilakukan oleh Antibodi Proteasom yang diberikan pada kelompok perlakuan. Hal ini juga didukung oleh hasil dari uji *one way anova* pada derajat parasit setiap 12 jam pengamatan yang mendapatkan hasil signifikan dengan nilai  $p < 0,05$  yang berarti ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan perlakuan pada masing-masing jam ke-12, 24, 36, dan 48 pengamatan. Efek penghambatan pertumbuhan parasit tersebut terjadi karena adanya efek inhibisi oleh Antibodi Proteasom terhadap Proteasom 20S dari *Plasmodium* tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rivo *et al* (2013) tentang efek dari salah satu inhibitor Proteasom yaitu *Eponemycin*, yang terkandung pada ekstrak *Streptomyces hygroscopicus*, terbukti menurunkan derajat parasit secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan *Eponemycin*. Namun pada pengamatan didapatkan derajat parasit yang meningkat pada kelompok perlakuan pada jam ke 48 setelah pemberian hal ini terjadi diduga karena efek Antibodi Proteasom yang telah mencapai durasi maksimumnya pada 36 jam setelah pemberian. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa Antibodi Proteasom memiliki efek inhibisi terhadap Proteasom 20S dari *Plasmodium falciparum* 3D7.

### **6.3 Hasil Analisis Pengamatan Morfologi Parasit**

Pada penelitian ini efek dari pengaruh pemberian terapi antibodi proteasom juga diamati melalui perubahan morfologi yang terjadi pada parasit *Plasmodium falciparum* 3D7. Penghambatan terhadap perkembangan *Plasmodium falciparum* akan mengakibatkan munculnya bentukan *crisis form*. *Crisis form* merupakan suatu bentuk dimana terdapat penebalan inti Plasmodium yang diikuti dengan sitoplasma yang menjadi sedikit pucat karena teragregasi ke dalam inti. *Crisis form* dikatakan

sebagai bentuk terakhir dari *Plasmodium falciparum* yang akan berapoptosis. Dikatakan sebelumnya bahwa bentukan *crisis form* dilaporkan muncul pada *Plasmodium falciparum* yang diterapi dengan Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), Steroid dari tumbuhan *Solanum nudum*, dan juga klorokuin (Lopez *et al*, 2010) Semua zat di atas menghambat pertumbuhan Plasmodium dengan cara menimbulkan suatu stress oksidatif pada Plasmodium, menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan parasit akan berapoptosis. Mekanisme tersebut memiliki kesamaan dengan mekanisme penghambatan Proteasom dari obat-obatan penghambat Proteasom. Antibodi proteasom yang telah diproduksi akan memblok proteasom 20S dari *Plasmodium falciparum* 3D7 dan akan menghambat proses degradasi protein yang tidak dibutuhkan oleh *Plasmodium* sehingga protein tersebut akan menumpuk dan timbul stress pada parasit yang akhirnya akan mengakibatkan *Plasmodium cell death*.

Pengamatan perubahan morfologi parasit dilakukan pada waktu bersamaan dengan analisis perhitungan derajat parasit yaitu setiap 12 jam sekali setelah seluruh sampel kultur *P. falciparum* 3D7 diberikan perlakuan masing-masing. Pada 12 jam pertama tidak terdapat adanya perubahan morfologi dari setiap sampel. Lalu pada 24 jam setelah perlakuan, mulai ditemukan adanya bentukan *crisis form* pada sampel A dan B. Pada jam ke-36 dan jam ke-48 bentukan *crisis form* mulai ditemukan pada sampel C dan semakin banyak ditemukan pada sampel A dan B. Sementara itu pada kontrol positif dan sampel D tidak ditemukan adanya bentukan *crisis form* pada pengamatan jam ke-12, 24, 36, maupun jam ke-48. Hal ini mengartikan bahwa tidak terjadi penghambatan pertumbuhan parasit pada kultur yang tidak diberi perlakuan Antibodi (kontrol positif) dan juga pada kultur yang diberikan Antibodi yang tidak spesifik terhadap Proteasom (Sampel D). Dari analisis ini dapat disimpulkan bahwa Antibodi Proteasom menyebabkan adanya efek

penghambatan pada pertumbuhan parasit yang ditandai dengan munculnya bentuk *crisis form* pada sampel perlakuan A, B, dan C.



## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa antibodi proteasom yang diproduksi memiliki efek penghambatan pertumbuhan *P. falciparum* 3D7 pada kelompok perlakuan A, B, dan C yang diberi perlakuan Antibodi Proteasom dengan dosis masing-masing 100 µg/ml, 200 µg/ml, dan 300 µg/ml. Efek penghambatan tersebut ditandai dengan perubahan morfologi *P. falciparum* 3D7 dimana bermunculan *crisis form* pada kelompok perlakuan A, B, dan C. Selain itu kesimpulan juga didukung oleh hasil perhitungan derajat parasitemia mikroskopik dimana sampel kelompok perlakuan A, B, dan C memiliki derajat parasitemia yang lebih rendah dibanding sampel kelompok kontrol positif dan sampel kelompok perlakuan D.

#### 7.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan efek penghambatan Antibodi Proteasom terhadap pertumbuhan Plasmodium secara *in vivo*, guna pengembangan Antibodi Proteasom sebagai kandidat vaksin pencegahan malaria.