

EFEK TERAPI KOMBINASI KLOROKUIN DAN SERBUK *Lumbricus rubellus* TERHADAP EKSPRESI GEN ICAM-1 PADA MENCIT SWISS YANG DIINFEKSI *Plasmodium berghei* ANKA

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



DEVI NURUL BAETI

G0006065

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2010**

PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan penulis juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, 16 Juli 2010

Devi Nurul Baeti
NIM. G0006065

ABSTRAK

DEVI NURUL BAETI, G0006065, 2010. Efek Terapi Kombinasi Klorokuin dan Serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap Ekspresi Gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA.

Penyakit malaria masih merupakan masalah kesehatan bagi dunia. Penelitian membuktikan bahwa ICAM-1 sangat berperan pada proses *cytoadherence* dan *rosetting* yang menyebabkan komplikasi malaria serebral. *Lumbricus rubellus* telah banyak digunakan dalam pengobatan penyakit-penyakit dan memiliki efek fibrinolitik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik. Hewan uji yang digunakan adalah Mencit Swiss jantan berumur 3 bulan dengan berat badan 20-30 gram. Mencit dibagi ke dalam 5 kelompok. Kelompok I adalah kelompok dimana mencit tidak diberi perlakuan apapun. Kelompok II adalah kelompok mencit yang hanya diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Kelompok III adalah kelompok mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA dan diberikan terapi klorokuin. Kelompok IV adalah kelompok mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA dan diberikan terapi klorokuin serta serbuk *Lumbricus rubellus*. Kelompok V adalah kelompok mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA dan diberikan terapi serbuk *Lumbricus rubellus*. Organ limpa mencit diambil untuk dilakukan isolasi RNA, RT-PCR dan elektroforesis untuk melihat gambaran gen ICAM-1. Hasil elektroforesis dianalisis secara semikuantitatif menggunakan *INH software*.

Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan ekspresi gen ICAM-1 diantara kelompok perlakuan dan hasil yang paling baik ditunjukkan oleh kelompok IV. Hasil uji *Kruskal Wallis* masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Uji *post hoc Mann Whitney* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$, kecuali antara kelompok I dan III, I dan IV, serta III dan IV.

Terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* pada mencit model malaria menunjukkan hasil yang lebih baik dalam menghambat ekspresi gen ICAM-1 dibandingkan terapi hanya dengan menggunakan klorokuin atau *Lumbricus rubellus*.

Kata kunci : malaria, klorokuin, *Lumbricus rubellus*, ICAM-1

ABSTRACT

DEVI NURUL BAETI, G0006065, 2010. The Effect of Combination Therapy of Chloroquin and *Lumbricus rubellus* to the ICAM-1 gene expression in Swiss Mice that Infected by *Plasmodium berghei* ANKA.

Malaria is still a problem in the world. Research has been proven that ICAM-1 has a role on *cytoadherence* and *rosetting* that causes cerebral malaria complication. *Lumbricus rubellus* already used to cure many diseases and has fibrinolytic activity. This research was aimed to know the effect of combination therapy of chloroquin and *Lumbricus rubellus* to the ICAM-1 gene expression in Swiss Mice that were infected by *Plasmodium berghei* ANKA.

The method of this research was laboratoric experimental. The mice that were used in this research were male, the age was 3 months with weight about 20-30 g. Mice were divided into 5 groups. First group was got no treatment. Second group was only infected by *Plasmodium berghei* ANKA. Third group was infected by *Plasmodium berghei* ANKA and got chloroquin as therapy. Fourth group was infected by *Plasmodium berghei* ANKA and got combination therapy both chloroquin and *Lumbricus rubellus*. Fifth group was infected by *Plasmodium berghei* ANKA and got *Lumbricus rubellus* as therapy. The spleen of the mice was taken, then the isolation of RNA, RT-PCR and electrophoresis were done to measure the ICAM-1 gene expression. The result of electrophoresis was analyzed in semiquantitative with INH software.

The result shows that there is difference of ICAM-1 gene expression and the best result is showed by group IV. The *Kruskal Wallis* test shows that there is difference significantly in the every group ($p < 0.05$). The *Post Hoc Mann Whitney* test shows that there is difference significantly between all of the group ($p < 0.05$), except between group I and III, I and IV, III and IV.

Combination therapy of chloroquin and *Lumbricus rubellus* in malaria mice shows a better result in inhibit ICAM-1 gene expression than therapy with chloroquin or *Lumbricus rubellus* only.

Keywords : malaria, chloroquin, *Lumbricus rubellus*, ICAM-1

PRAKATA

Puji syukur peneliti panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala berkah, nikmat, serta hidayahNya, sehingga dengan itu semua penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul ” **Efek Terapi Kombinasi Klorokuin dan Serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap Ekspresi Gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA**”.

Penelitian ini disusun dan diajukan peneliti guna memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Dalam penyelesaian skripsi ini peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. H. AA Subiyanto, dr., MS. selaku Pimpinan Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
2. Sri Wahjono, dr., M.Kes. selaku Ketua Tim Skripsi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
3. Paramasari Dirgahayu, dr., Ph. D selaku pembimbing utama dalam penelitian ini atas bimbingan dan masukan yang diberikan.
4. Sigit Setyawan, dr. selaku pembimbing pendamping dalam penelitian ini atas bimbingan dan masukan yang diberikan.
5. Ruben Dharmawan, dr., Ir., Ph.D., SpParK selaku penguji utama atas masukan, kritik dan saran yang telah diberikan.
6. Mujosemedi, Drs., MSc. selaku anggota penguji atas masukan, kritik dan saran yang telah diberikan.
7. Segenap staf skripsi, staf Laboratorium Parasitologi FK UNS atas segala bantuan dan kerja samanya dalam penyusunan skripsi ini.
8. Bapak, Ibu dan adikku yang telah memberikan dorongan, doa, bantuan moral dan materi.
9. Teman-teman PBL D5 dan Kos Anisa 2 terimakasih atas bantuan dan dukungannya.
10. Seluruh teman-teman angkatan 2006.
11. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari akan kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat konstruktif sangat penulis harapkan. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Surakarta, 16 Juli 2010

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR	
TABEL.....	xi
DAFTAR GRAFIK.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II LANDASAN TEORI	
A. Tinjauan Pustaka.....	6
1. Malaria.....	6
2. <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)</i>	11
3. Cacing <i>Lumbricus rubellus</i>	13
4. <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	19
5. Klorokuin.....	21
6. Mencit Swiss.....	22
B. Kerangka Berpikir.....	24

C. Hipotesis.....	25
-------------------	----

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian.....	26
B. Lokasi Penelitian.....	26
C. Subyek Penelitian.....	26
D. Hewan Uji.....	26
E. Teknik Sampling.....	27
F. Identifikasi Variabel Penelitian.....	27
G. Definisi Operasional Penelitian.....	28
H. Rancangan (Desain Penelitian).....	30
I. Alat dan Bahan.....	32
1. Alat.....	32
2. Bahan.....	33
J. Cara Kerja.....	34
1. Kultur <i>Plasmodium berghei in vivo</i> (perbanyak parasit).....	34
2. Perlakuan terhadap mencit.....	35
3. Penentuan Parasitemia.....	36
4. Pengambilan Sampel Limpa.....	36
5. Pemeriksaan Ekspresi Gen ICAM-1 dan β -actin.....	37
a. Ekstraksi RNA.....	37
b. RT-PCR.....	39
c. Elektroforesis.....	43

K. Analisis Data.....	46
BAB IV HASIL PENELITIAN	
A. Data Hasil Penelitian.....	47
B. Analisis Data.....	50
BAB V PEMBAHASAN.....	53
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN	
A. Simpulan.....	58
B. Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Perlekatan P-RBC pada permukaan endotel vaskuler (<i>cytoadherence</i>)....	9
Gambar 2. <i>Rosetting</i>	10
Gambar 3. Gambar apusan darah tipis dengan pewarnan giemsa yang diambil dari sampel darah mencit yang diinfeksi <i>Plasmodium</i> <i>berghei</i> ANKA.....	48

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Data parasitemia mencit.....	48
Tabel 4.2. Hasil penghitungan ekspresi gen ICAM-1.....	49
Tabel 4.3. Hasil perhitungan dengan uji <i>Mann-Whitney</i>	51

DAFTAR GRAFIK

Grafik 1. Grafik rata-rata hitung hitung ekspresi gen ICAM-1.....	49
--	----

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1.** Tabel Konversi Dosis Manusia dan Hewan
- Lampiran 2.** Tabel Daftar Volume Maksimal Larutan Sediaan Uji yang Dapat Diberikan pada Berbagai Hewan
- Lampiran 3.** Gambar Cara Kerja Penelitian
- Lampiran 4.** Protokol Isolasi RNA TRIZOL dan RT-PCR dari Invitrogen
- Lampiran 5.** Hasil Penghitungan Ekpresi Gen ICAM-1 Dengan *INH Software*
- Lampiran 6.** Hasil Uji Deskriptif, Normalitas, dan Varians Hitung Ekspresi Gen ICAM-1 Menggunakan Program *SPSS for Windows Release 16.0*
- Lampiran 7.** Hasil Uji Analisis *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* dengan Program *SPSS for Windows Release 16.0*
- Lampiran 8.** *Ethical Clearance*
- Lampiran 9.** Label Produk “Kaicing”

BAB 1

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Penyakit malaria masih merupakan masalah kesehatan bagi negara tropik/sub-tropik dan negara berkembang maupun negara yang sudah maju. Penyakit ini merupakan penyebab kematian utama penyakit tropik dan diperkirakan satu juta penduduk dunia meninggal tiap tahunnya dan terjadi kasus malaria baru 200-300 juta/tahun (Harijanto, 2007).

Di Indonesia terdapat empat spesies parasit malaria yaitu *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, dan *P. malariae*. Infeksi *Plasmodium falciparum* merupakan penyebab kesakitan dan kematian tertinggi diantara jenis malaria lainnya (Harijanto, 2007). Hal ini karena *P. falciparum* dapat menyebabkan komplikasi yang serius dan fatal, seperti malaria serebral, anemia, hipoglikemi, *renal failure*, dan *non-cardiac pulmonary edema* (Miller *et al.*, 1994).

Dasar patogenesis pada infeksi *P. falciparum* adalah kemampuannya menyebabkan *Parasite-Red Blood Cell* (P-RBC) mengadakan *cytoadherence* (penempelan) pada pembuluh darah kecil (kapiler/ venula). Sekuestrasi parasit ini dapat menyebabkan obstruksi perfusi jaringan (Dondorp *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1971). Interaksi antara P-RBC dan sel endotel dapat terjadi karena adanya berbagai reseptor yang tersedia untuk berikatan, antara lain ICAM-1, VCAM-1, CD-36, dan thrombospondin (Barnwell *et al.*, 1989; Berendt *et al.*, 1989;

Ockenhouse *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1985). Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan didapatkan bahwa ada beberapa reseptor yang sering digunakan dibanding reseptor lain. Misalnya, ICAM-1 selalu tersedia pada kasus malaria anak (Dormeyer *et al.*, 2006). Selain itu, P-RBC juga mengadakan *rosetting*, yaitu penempelan P-RBC pada eritrosit non-parasit (Harijanto, 2007). *Cytoadherence* dan *rosetting* pada akhirnya akan menimbulkan sumbatan pembuluh darah kapiler/ vena yang menyebabkan kerusakan pada organ-organ yang divaskularisasi (Biggs dan Brown, 2001).

Penempelan P-RBC pada sel endotel oleh ICAM-1, terutama pada organ-organ yang vital, mungkin akan mengarah pada penyakit yang berat dan kematian (Kun *et al.*, 1999). Apabila terjadi penempelan P-RBC pada vena otak dapat menyebabkan komplikasi malaria yang fatal, yaitu malaria serebral (Smith *et al.*, 2000).

Limpa merupakan organ yang penting dalam sistem imun tubuh, terutama terhadap mikroorganisme yang masuk ke sirkulasi, sehingga mempunyai peran yang penting dalam mengatasi infeksi malaria (*clearance*). Proses *cytoadherence* merupakan salah satu cara *Plasmodium* untuk menghindari *clearance* limpa. Dengan kata lain, *cytoadherence* merupakan mekanisme pertahanan dari *Plasmodium* untuk menghindari sirkulasi darah. Akan tetapi, fenomena *cytoadherence* dapat menyebabkan oklusi pembuluh darah limpa dan menyebabkan kerusakan organ limpa (Mohanty *et al.*, 2006).

Berbagai cara dilakukan untuk mencegah terjadinya komplikasi malaria, salah satunya yaitu dengan mencari terapi tambahan (*adjuvant*). Banyak penelitian telah dilakukan untuk mencegah terjadinya *cytoadherence* pada malaria falciparum dengan menggunakan zat yang bersifat antikoagulan, diantaranya dengan menggunakan heparin. Meskipun zat ini memiliki kemampuan antiadhesi P-RBC, akan tetapi karena efek sampingnya yang dapat menyebabkan perdarahan, zat ini tidak direkomendasikan sebagai obat rutin untuk malaria falciparum. Selain heparin, ada juga yang menggunakan Lomolecular dextran (Lomodex). Zat ini dapat meningkatkan sirkulasi serebral pada malaria falciparum yaitu dengan mengurangi viskositas darah. Akan tetapi dextran kadang-kadang dapat menyebabkan reaksi anafilaktik. Seperti heparin, obat inipun tidak dianjurkan oleh WHO (Mohanty *et al.*, 2006). Oleh karena itu, masih diperlukan obat lain yang dapat menurunkan atau mencegah terjadinya *cytoadherence* dengan tingkat keamanan yang lebih baik.

Sejak beberapa ribu tahun lalu cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) telah banyak digunakan secara luas di China dan negara-negara timur lainnya untuk mengobati berbagai macam penyakit. Bahkan, akhir-akhir ini, *Lumbricus rubellus* mulai banyak digunakan dalam pengobatan alergi, stroke, dan kanker (*Allergy Research Group*, 2009; *Enzyme Stuff*, 2005; Nurachman, 2001). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mihara *et al.* (1991), cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terbukti mengandung enzim fibrinolitik yang disebut Lumbrokinase. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ji *et al.* (2008), efek antitrombosis enzim

Lumbrokinase ternyata dapat menghambat ekspresi gen ICAM-1 pada otak tikus yang mengalami iskemik serebral. Dengan demikian, ada kemungkinan cacing *Lumbricus rubellus* dapat mengurangi atau mencegah terjadinya *cytoadherence* dan *rosetting* P-RBC *Plasmodium falciparum* oleh ICAM-1. Dalam hal ini, berarti *Lumbricus rubellus* mungkin dapat digunakan sebagai terapi *adjuvant* dalam pengobatan malaria.

Berdasarkan informasi di atas dan belum adanya penelitian mengenai efek terapi *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen ICAM-1 pada malaria, maka peneliti tertarik untuk meneliti apakah terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* dapat mempengaruhi ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* ANKA.

B. PERUMUSAN MASALAH

Bagaimana efek terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA?

C. TUJUAN PENELITIAN

Untuk mengetahui efek terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA.

D. MANFAAT PENELITIAN

1. Manfaat Teoritis

- a. Dapat memberikan informasi mengenai efek terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA.
- b. Dapat dipakai sebagai bahan rujukan untuk penelitian lebih lanjut.

2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat dan ilmu pengetahuan tentang manfaat serbuk cacing *Lumbricus rubellus* yang mungkin potensial untuk digunakan sebagai obat tambahan (*adjuvant*) yang direkomendasikan untuk dikombinasi dengan obat pilihan pada terapi malaria.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. TINJAUAN PUSTAKA

1. Malaria

Malaria merupakan penyakit infeksi protozoa yang disebabkan oleh *Plasmodium* yang menyerang eritrosit dan ditandai dengan ditemukannya bentuk aseksual di dalam darah. Infeksi malaria memberikan gejala berupa demam, menggigil, anemia, dan splenomegali. Selain menginfeksi manusia, *Plasmodium* juga dapat menginfeksi binatang seperti golongan aves, reptil dan mamalia. Infeksi malaria dapat berlangsung akut maupun kronis. *Plasmodium* ini pada manusia menginfeksi eritrosit dan mengalami perkembangan aseksual di jaringan hati dan di eritrosit. Perkembangan seksual terjadi pada tubuh nyamuk yaitu *Anopheles* betina (Harijanto, 2007; Strickland, 1995).

Penularan malaria terjadi melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina atau melalui inokulasi langsung sel-sel darah merah yang telah terinfeksi. Stadium infeksi *Plasmodium* disebut sporozoit. Sporozoit yang berhasil masuk ke dalam tubuh manusia sebagian besar mengikuti aliran darah menuju hepar dan sebagian kecil dirusak dengan fagositosis oleh makrofag dalam darah (Harijanto, 2007; Strickland, 1995).

Dalam tubuh manusia, *Plasmodium* mengalami 2 fase, yaitu :

a. Fase eksoeritrositik

Pada fase ini, sporozoit berada dalam sel parenkim hati dan berkembang menjadi tropozoit hati. Kemudian berkembang menjadi skizon hati yang terdiri dari 10.000-30.000 merozoit yang masing-masing berdiameter 0,7-1,3 μm . Meskipun nukleus sel hati diganti, tidak terjadi reaksi inflamasi disekitar jaringan hati.

Setelah 6-16 hari dari waktu infeksi, sel hepar yang mengandung skizon ruptur dan merozoit masuk ke dalam sirkulasi darah. Pada infeksi *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae*, semua skizon ruptur dalam waktu yang bersamaan. Sedangkan pada *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* sebagian parasit di dalam sel hati membentuk hipnozoit yang dapat bertahan hingga bertahun-tahun dan dapat menyebabkan relaps malaria (Strickland, 1995).

b. Fase eritrosit

Merozoit yang dihasilkan oleh skizon menginvasi eritrosit dan masuk melalui reseptor permukaan eritrosit. Pada *Plasmodium vivax* reseptor ini berhubungan dengan faktor antigen Duffy *Fya* dan *Fyb*. Hal ini menyebabkan individu dengan golongan darah Duffy negatif tidak terinfeksi malaria vivax. Reseptor untuk *Plasmodium falciparum* diduga suatu *glycophorins*, sedangkan untuk *Plasmodium malariae* dan *Plasmodium ovale* belum diketahui. Dalam waktu kurang dari 12 jam

parasit berubah menjadi bentuk cincin, pada *Plasmodium falciparum* menjadi bentuk *stereo-headphones*, yang mengandung kromatin dalam intinya dikelilingi sitoplasma. Selama perkembangannya, parasit menggunakan hemoglobin dan membentuk pigmen hemozoin atau hemozoin.

Eritrosit yang terinfeksi menjadi lebih elastik dan dinding berubah lonjong, pada *Plasmodium falciparum* membentuk tonjolan yang disebut *knob*. Setelah 36 jam invasi ke dalam eritrosit, parasit berubah menjadi skizon, dan bila skizon pecah akan mengeluarkan 6-36 merozoit dan siap menginfeksi eritrosit lain. Siklus aseksual ini pada *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* ialah 48 jam dan pada *Plasmodium malariae* adalah 72 jam (Harijanto, 2007).

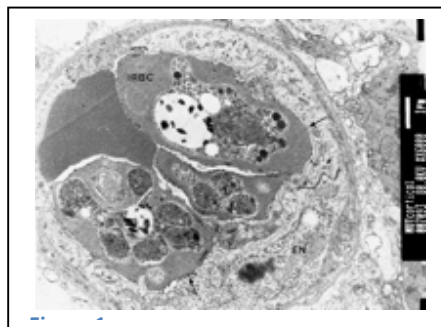
Siklus aseksual parasit dalam eritrosit atau *parasite-Red Blood Cell* (P-RBC) inilah yang bertanggung jawab dalam patogenesis terjadinya malaria pada manusia. Berikut ini adalah patogenesis dari penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* :

1) *Cytoadherence*

Parasit dalam eritrosit mengalami 2 stadium, yaitu stadium cincin pada 24 jam I dan stadium matur pada 24 jam ke II. Permukaan P-RBC stadium cincin akan menampilkan antigen *Ring-Erythrocyte Surface Antigen* (RESA) yang menghilang setelah parasit masuk stadium matur. Permukaan membran P-RBC stadium matur akan

mengalami penonjolan dan membentuk *knob* dengan *Histidin Rich-Protein-1* (HRP-1).

Molekul adhesif pada permukaan *knob* P-RBC yaitu *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membran Protein-1* (PfEMP-1) akan melekat dengan molekul adhesif pada permukaan endotel vaskular yang berupa CD36, trombospondin, *intercellular-adhesion molecule -1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *endothel leucocyte adhesion molecule-1* (ELAM-1) dan *glycosaminoglycan chondroitin sulfate A*. Perlekatan P-RBC pada permukaan endotel vaskuler inilah yang disebut *cytoadherence*. PfEMP merupakan protein-protein hasil ekspresi genetik oleh sekelompok gen yang berada dipermukaan *knob*. Kelompok gen ini disebut gen VAR. Gen ini mempunyai kapasitas variasi antigenik yang sangat besar.



Gambar 1. Perlekatan P-RBC pada permukaan endotel vaskuler (*cytoadherence*)

2) Sekuestrasi

Cytoadherence menyebabkan P-RBC matur tidak beredar kembali dalam sirkulasi. P-RBC yang berada di jaringan mikrovaskular ini disebut P-RBC yang mengalami sekuestrasi. Hanya *Plasmodium falciparum* yang mengalami sekuestrasi. Sekuestrasi terjadi pada organ-organ vital dan hampir semua jaringan dalam tubuh. Sekuestrasi tertinggi terjadi di otak, diikuti dengan hepar dan ginjal, paru, jantung, usus dan kulit.

3) Rosetting

Rosetting adalah berkelompoknya P-RBC matur yang diselubungi 10 atau lebih eritrosit non-parasit. *Rosetting* menyebabkan obstruksi aliran darah lokal atau dalam jaringan sehingga mempermudah terjadinya *cytoadherence*.



Gambar 2. *Rosetting*

4) Sitokin

Sitokin terbentuk dari sel endotel, monosit, dan makrofag setelah mendapat stimulasi dari malaria toksin (LPS, GPI). Sitokin ini antara lain TNF- α , IL-1, IL-6, IL-3, LT, dan INF- γ . TNF- α

menyebabkan peningkatan molekul adhesi endotel ICAM-1, VCAM-1, dll dan juga meningkatkan IL-1 dan IL-6. Selain itu, aktivasi TNF- α juga dapat meningkatkan jumlah TNF- α itu sendiri.

(Harijanto, 2007)

2. *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1)

Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) merupakan salah satu reseptor pada permukaan sel endotel yang berperan pada penempelan eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* atau *Parasite-Red Blood Cell* (P-RBC). Reseptor lainnya berupa CD36, trombospondin, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *endothel leucocyte adhesion molecule-1* (ELAM-1) dan *glycosaminoglycan chondroitin sulfate A* (Harijanto, 2007).

ICAM-1 juga dikenal sebagai CD54 (*Cluster of Differentiation 54*). ICAM-1 memiliki berat molekul antara 70-120 kilodalton (Rothlein *et al.*, 1991). Protein yang mengatur gen ini adalah tipe *intercellular adhesion molecule*. Protein tersebut secara konstan terdapat pada membran sel leukosit dan endotel dalam konsentrasi yang rendah. Konsentrasi ICAM-1 dapat meningkat dengan adanya induksi oleh *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), dan *interleukin-1* (IL-1) dan interferon- γ (IFN- γ). ICAM-1 merupakan glikoprotein yang bertindak sebagai ligan dari integrin LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*), sebuah reseptor yang ditemukan pada

leukosit. Ketika teraktivasi, leukosit menempel pada sel endotel melalui ICAM-1/ LFA-1 dan kemudian masuk ke jaringan (Ho dan White, 1999).

ICAM-1 memainkan peran yang penting pada patologi malaria. ICAM-1 akan berikatan dengan molekul adhesif pada P-RBC yaitu *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membran Protein-1* (PfEMP-1). Penempelan sel yang terinfeksi (P-RBC) pada endotelium, terutama pada organ-organ vital oleh ICAM-1 mungkin akan mengarah pada penyakit yang berat dan kematian. Secara histopatologis ditunjukkan adanya ICAM-1 dan penempelan eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* dalam kapiler otak pada pasien malaria serebral. Pada pasien malaria serebral terjadi penempelan ICAM-1 dan parasit dalam jumlah yang tertinggi (Kun *et al.*, 1999).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Shear *et al.* (1998) didapatkan bahwa ekspresi ICAM-1 mengalami peningkatan yang signifikan pada kapiler dan venula kecil otak mencit yang diinfeksi malaria. Sebaliknya, peningkatan ekspresi VCAM-1 tidak sebesar ekspresi ICAM-1. Selain itu, ekspresi VCAM-1 terbatas pada pembuluh darah yang besar. Jadi, dapat disimpulkan bahwa ICAM-1 merupakan reseptor sel endotel yang memegang peran penting dalam patogenesis malaria serebral.

Peningkatan ICAM-1 juga ditemukan pada keadaan lain seperti melanoma maligna (Harning *et al.*, 1991), uveitis (Arocker *et al.*, 1992), transplantasi ginjal dan liver (Stockenhuber *et al.*, 1992), gagal jantung akut

(Gottsauer *et al.*, 1992), rheumathoid arthritis (Machold *et al.*, 1993), fibrosis paru idiopatik (Shijubo *et al.*, 1992), dan neonatal sepsis (Kuster dan Degitz, 1993).

3. Cacing tanah *Lumbricus rubellus*

a. Taksonomi

Taksonomi *Lumbricus rubellus* adalah sebagai berikut :

Super Kingdom : Eukaryota

Kingdom : Animalia

Sub Kingdom : Metazoa

Filum : Annelida

Kelas : Oligochaeta

Ordo : Haplotaxida

Sub Ordo : Lumbricina

Famili : Lumbricidae

Genus : *Lumbricus*

Spesies : *Lumbricus rubellus*

(Leiden University Medical Center, 2005)

b. Nama Lain

Di luar negeri cacing *Lumbricus rubellus* disebut juga dengan *Red earthworm*, *Red Wiggler*, *(European) earthworm*, *Driftworm*, *Gardenworm*, *red marsh worm* (Davidson, 2007; Wardhani, 2007). Sedangkan di

Indonesia, cacing ini dikenal dengan sebutan cacing merah atau cacing lumbricus (Palungkun, 2008).

c. Deskripsi *Lumbricus rubellus*

Cacing tanah jenis *Lumbricus* mempunyai bentuk tubuh gilig. Tubuhnya terdapat segmen luar dan dalam, berambut, tidak mempunyai kerangka luar, tubuhnya dilindungi oleh kutikula (kulit bagian luar), tidak memiliki alat gerak dan tidak memiliki mata. Jumlah segmen yang dimiliki sekitar 90-195 dan klitelum yang terletak pada segmen 27-32. Klitelium merupakan alat yang membantu perkembangan dan baru muncul saat cacing mencapai dewasa kelamin, sekitar 2 bulan (Ristek, 2009).

Adanya lendir pada tubuhnya yang dihasilkan oleh kelenjar epidermis mempermudah pergerakannya. Pada setiap segmennya terdapat organ seta yang berupa rambut yang relatif keras, berukuran pendek, dan memiliki daya lekat yang sangat kuat. Selain itu, terdapat pula prostomium yang merupakan organ syaraf perasa dan berbentuk seperti bibir.

Di bagian akhir tubuhnya terdapat anus untuk mengeluarkan sisa-sisa makanan dan tanah yang dimakannya. Kotoran yang keluar dari anus *Lumbricus rubellus* dikenal dengan istilah kascing. Kascing terdiri dari berbagai komponen biologis (giberelin, sitokinin, auxin) maupun kimiawi (nitrogen, fosfor, kalium, belerang, magnesium, besi) yang sangat diperlukan untuk perkembangan dan pertumbuhan tanaman. Selain itu,

kascing bersifat netral dengan pH 6,5-7,4 dan rata-ratanya adalah 6,8 (Palungkun, 2008).

d. Distribusi dan habitat

Tanah sebagai media hidup cacing harus mengandung bahan organik dalam jumlah yang besar. Bahan-bahan organik tanah dapat berasal dari serasah (daun yang gugur), kotoran ternak atau tanaman dan hewan yang mati. Cacing tanah menyukai bahan-bahan yang mudah membusuk karena lebih mudah dicerna oleh tubuhnya.

Untuk pertumbuhan yang baik, cacing tanah memerlukan tanah yang sedikit asam sampai netral atau pH sekitar 6-7,2. Dengan kondisi ini, bakteri dalam tubuh cacing tanah dapat bekerja optimal untuk mengadakan pembusukan atau fermentasi. Kelembaban yang optimal untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan cacing tanah adalah antara 15-30%. Suhu yang diperlukan untuk pertumbuhan cacing tanah adalah sekitar 15–25⁰ C atau suam-suam kuku. Suhu yang lebih tinggi dari 25⁰ C masih baik asal ada naungan yang cukup dan kelembaban optimal (Ristek, 2009).

e. Kandungan Kimia dan Manfaat

Sejak ribuan tahun lalu *Lumbricus rubellus* telah banyak digunakan oleh masyarakat Cina sebagai obat berbagai macam penyakit (Mihara *et al.*, 1991).

Kandungan gizi *Lumbricus rubellus* cukup tinggi, terutama kandungan proteinnya yang mencapai 64-76% (Palungkun, 2008).

Kandungan protein cacing ini ternyata lebih tinggi dari sumber protein lainnya, misalnya daging (65%) dan kacang kedelai (45%). Oleh karena itu, di Jepang, Hongaria, Thailand, Filipina, dan Amerika Serikat cacing ini juga dimanfaatkan sebagai bahan makanan manusia selain digunakan untuk ramuan obat dan bahan kosmetik (Sajuthi *et al.*, 2003).

Protein yang sangat tinggi pada tubuh *Lumbricus rubellus* ini terdiri dari setidaknya sembilan asam amino esensial dan empat macam asam amino non-esensial. Asam amino esensial ini antara lain arginin, histidin, leusin, isoleusin, valin, metionin, fenilalanin, lisin, dan treonin. Sedangkan asam amino non-esensial ialah sistin, glisin, serin, dan tirosin (Palungkun, 2008).

Banyaknya asam amino yang terkandung dalam tubuh cacing tanah ini memberikan gambaran bahwa tubuhnya mengandung berbagai jenis enzim yang sangat berguna bagi kesehatan manusia. Dari berbagai penelitian didapat bahwa *Lumbricus rubellus* mengandung enzim Lumbrokinase, peroksidase, katalase, dan selulosa (Palungkun, 2008).

Selain protein, kandungan gizi lainnya yang terdapat dalam tubuh cacing tanah antara lain lemak 7-10%, kalsium 0,55%, fosfor 1%, dan serat kasar 1,08%. Cacing tanah juga mengandung auxin yang merupakan zat perangsang tumbuh untuk tanaman (Palungkun, 2008).

Menurut Mihara *et al.* (1991) enzim Lumbrokinase merupakan enzim fibrinolitik kuat yang dapat menghidrolisis gumpalan fibrin dan trombus

intravaskular. Pada purifikasi enzim ini dibagi menjadi 3 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut masih dibagi lagi menjadi subfraksi-subfraksi. Fraksi F-I dibagi menjadi 3 subfraksi (F-I-1, F-I-2, dan F-I-3) yang memiliki karakteristik biokimiawi yang hampir sama. Fraksi F-II tidak dibagi lagi. Sedangkan fraksi F-III dibagi menjadi 2 subfraksi (F-III-1 dan F-III-2). Karena dapat memisahkan ikatan *tyrosine*, fraksi F-I disebut sebagai *a chymotrypsin-like enzyme*. Fraksi F-III dapat memisahkan ikatan *arginin* dan *lysin*, sehingga disebut *a trypsin-like enzyme*. Sedangkan F-II tidak seperti *chymotrypsin* maupun *lysin*.

Lumbrokinase kaya akan asparagin dan asam aspartat, serta sedikit proline dan lysin. Lumbrokinase stabil terhadap panas dan memiliki pH optimal 7,4-9. Karena tidak memiliki pH optimal puncak, dapat dikatakan bahwa Lumbrokinase mampu bertahan pada rentang pH yang luas. Berdasarkan sifat yang dimilikinya, Lumbrokinase mempunyai kelebihan dibanding enzim proteolitik yang lain seperti plasmin dan urokinase karena Lumbrokinase dapat digunakan secara oral, sedangkan enzim lainnya secara parenteral (Mihara *et al.*, 1991).

Pada penelitian secara *in vitro*, Lumbrokinase dapat menghidrolisis fibrin kaya plasminogen, maupun fibrin bebas plasminogen, sehingga dapat disimpulkan bahwa Lumbrokinase bekerja sebagai perangsang plasminogen dan sekaligus dapat mencerna fibrin secara langsung (Mihara *et al.*, 1991).

Selain digunakan sebagai enzim fibrinolitik, *Lumbricus rubellus* juga sudah mulai dipakai sebagai antipiretik. Pengujian ekstrak cacing tanah untuk melihat aktivitasnya sebagai antipiretik dilakukan menggunakan hewan coba tikus putih yang didemamkan dengan penyuntikan vaksin campak. Suhu normal tikus putih mirip dengan manusia, yaitu berkisar antara 35,9⁰ hingga 37,5⁰ C. Tikus putih yang sudah demam diobati dengan ekstrak cacing tanah dan parasetamol sebagai kontrol. Setelah didemamkan, suhu tubuh tikus putih diukur dan diamati pergerakan suhunya. Kelompok tikus putih yang tidak diberi pengobatan meningkat suhunya hingga perbedaannya rata-rata 1,8⁰ C dari suhu normalnya, sementara yang diberi ekstrak cacing tanah hanya meningkat suhunya hingga perbedaannya 0,8⁰ C. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan suhu tikus putih yang didemamkan dapat ditahan oleh ekstrak cacing tanah. Bahkan, ketika telah dipisahkan senyawa aktifnya secara kasar, kenaikan suhu tikus putih yang didemamkan dapat ditahan hingga 0,4⁰ C saja (Sajuthi *et al.*, 2003).

Dari serangkaian pengujian kimia diketahui bahwa senyawa aktif sebagai antipiretik dari ekstrak cacing tanah adalah golongan senyawa alkaloid. Pengujian memang belum dapat menentukan nama senyawanya secara tepat. Golongan senyawa alkaloid mempunyai ciri mengandung atom nitrogen dan bersifat basa (Sajuthi *et al.*, 2003).

4. *Plasmodium berghei* ANKA

Taksonomi *Plasmodium berghei* adalah sebagai berikut :

Regnum : Animalia
Sub Regnum : Protozoa
Filum : Sporozoa
Kelas : Sporozoea
Sub Kelas : Coccidea
Super Ordo : Eucoccidea
Ordo : Haemosporida
Famili : Haemosporidae
Genus : Plasmodium
Spesies : *Plasmodium berghei*

(Wardhani, 2007)

Plasmodium berghei adalah hemoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil. Dasar biologi *Plasmodium* yang menyerang rodensia sama dengan *Plasmodium* yang menyerang manusia seperti siklus hidup maupun morfologinya, genetik dan pengaturan genomnya, fungsi dan struktur pada kandidat vaksin antigen target sama (Tambayong, 2000).

Plasmodium berghei memiliki 14 kromosom yang dapat dipisahkan secara pulsed-field gel electrophoresis. Ukuran genomnya diperkirakan mendekati ukuran genom *Plasmodium falciparum*, yaitu pada sekuen 25-30

Mb. Perbandingan Adenin/Timin pada genom *Plasmodium berghei* adalah 80% jika dibandingkan dengan Adenin/Timin *Plasmodium falciparum* (NIH, 2000).

Seperti parasit malaria pada manusia, *Plasmodium berghei* ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* dan dapat menginfeksi hepar setelah masuk pembuluh darah akibat gigitan nyamuk betina. Setelah mengalami multiplikasi dan perkembangan (beberapa hari), parasit meninggalkan hepar dan menginvasi eritrosit. Multiplikasi parasit di darah menyebabkan keadaan patologis seperti anemia dan merusak organ-organ penting dalam tubuh *host*, seperti paru-paru, hepar, dan lien (Harijanto, 2007).

Plasmodium berghei ANKA (PbA) banyak digunakan pada penelitian malaria *falciparum*, hubungan *host*-parasit, pengembangan vaksin malaria dan pengembangan obat dengan menggunakan mencit sebagai *host*. Hal tersebut didasarkan pada kemiripan aspek biologi dari *Plasmodium berghei* ANKA pada mencit dan *Plasmodium falciparum* pada manusia setelah dianalisis secara molekuler. Infeksi PbA pada rodensia juga menggambarkan adanya fenomena sekuestrasi P-RBC di kapiler organ dalam, misalnya limpa, paru dan hepar sehingga terjadi komplikasi pada organ dalam tersebut yang mana serupa dengan mekanisme *cythoadherence* dan *rosetting* pada infeksi *Plasmodium falciparum* pada manusia (Lou *et al.*, 2001)

Pada berbagai strain mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* terjadi kematian dalam 1-3 minggu dan banyak mencit yang menunjukkan gejala komplikasi serebral (Carter dan Diggs, 1977).

Untuk memelihara kelangsungan hidup *Plasmodium berghei* di laboratorium dilakukan dengan 2 cara, yaitu :

- a. Cara pertama yaitu dengan memelihara parasit ini dalam makhluk hidup (mencit); untuk itu setiap minggu beberapa ekor mencit sehat diinokulasi dengan darah yang mengandung 2% sporozoit. Pemindahan ini perlu karena mencit yang telah terinfeksi akan mati bila tak diobati.
- b. Cara kedua : darah yang telah terinfeksi dimasukkan ke dalam larutan gliserin kemudian disimpan dalam temperatur -70°C atau disimpan dalam tabung nitrogen cair (Sundari *et al.*, 1997).

5. Klorokuin

Klorokuin (*7-kloro-4-dietilamino-1-metil-butilamino*) kuinolin merupakan turunan 4-aminokuinolin. Klorokuin hanya efektif terhadap parasit dalam fase eritrosit, sama sekali tidak efektif terhadap parasit di jaringan. Efektivitasnya sangat tinggi terhadap *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, dan terhadap strain *Plasmodium falciparum* yang sensitif klorokuin. Selain itu, klorokuin juga efektif terhadap ketiga gamet *Plasmodium* tersebut, tetapi tidak terhadap *Plasmodium falciparum* (Amir dan Zunilda, 2007).

Mekanisme kerja klorokuin masih kontroversial. Salah satu mekanisme yang penting adalah penghambatan aktivitas polimerase heme plasmodia oleh klorokuin. Polimerase heme plasmodia ini digunakan untuk mendetoksifikasi *heme ferriprotoporphyrin IX* menjadi bentuk hemozoin yang tidak toksik. Heme ini merupakan senyawa yang bersifat membranolitik dan terbentuk dari pemecahan hemoglobin di vakuol makanan parasit. Peningkatan heme di dalam parasit menimbulkan lisis membran parasit (Amir dan Zunilda, 2007).

Resistensi terhadap klorokuin banyak ditemukan pada *Plasmodium falciparum*. Di Indonesia *Plasmodium falciparum* yang resisten klorokuin pertama kali ditemukan tahun 1974 di Kalimantan Timur. Resistensi semakin meluas ke beberapa wilayah karena mobilitas penduduk antar wilayah yang semakin meningkat dan tidak dapat segera diberantasnya malaria dari suatu wilayah. Faktor lainnya ialah tidak dipatuhinya aturan pemakaian obat. Obat yang seharusnya diminum seminggu, baru diminum tiga hari sudah dihentikan karena merasa sudah membaik, sehingga virus yang ada menjadi resisten terhadap daya kerja obat tersebut (Depkes, 2004).

6. Mencit Swiss

Taksonomi mencit Swiss adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

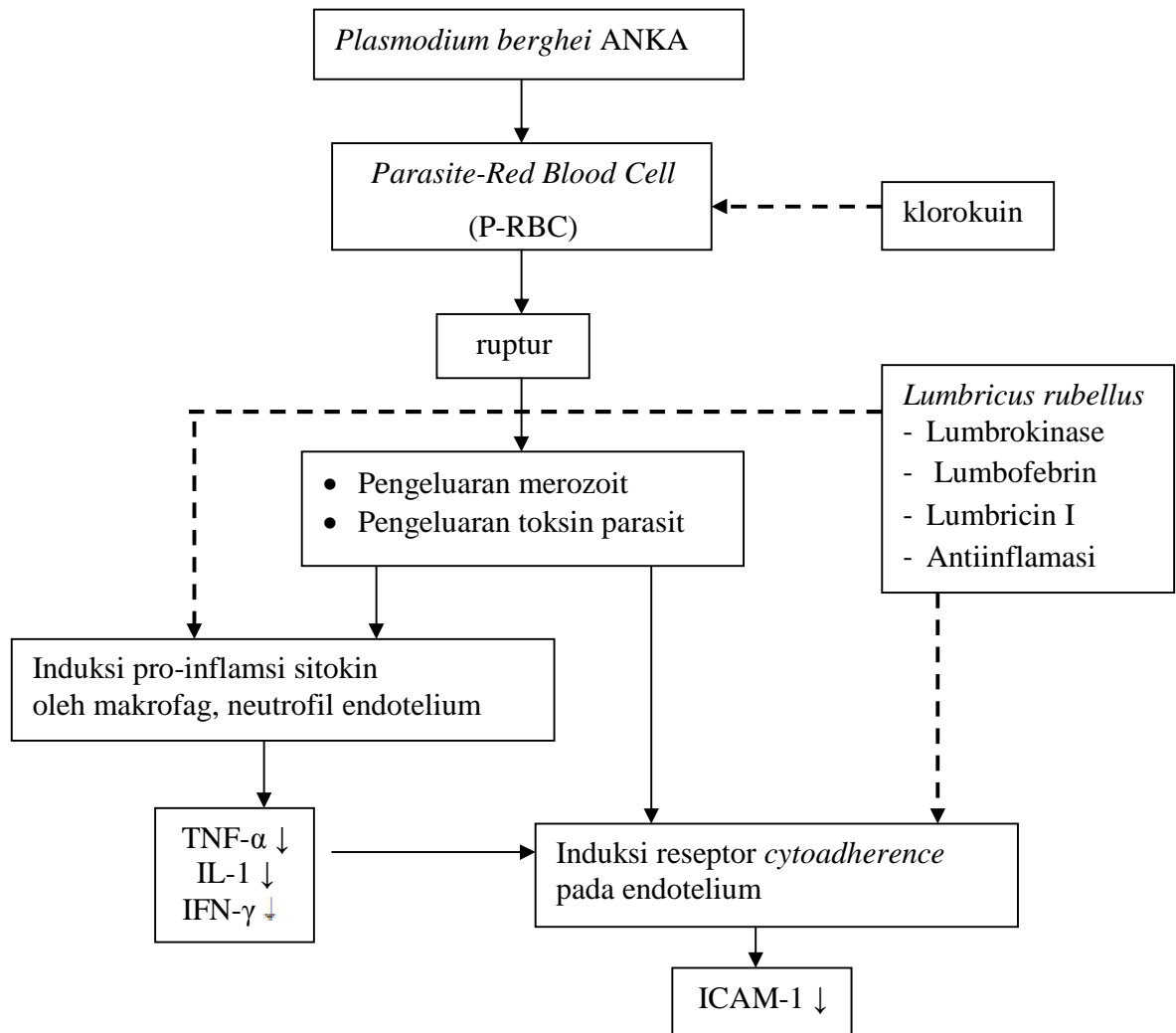
Kelas : Mammalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Mus
Spesies : *Mus Musculus*

(Anggonowati, 2008)

Mencit tergolong hewan pengerat. Menurut hasil penelitian Sundari *et al.* (1997), mengenai inokulasi *Plasmodium berghei* pada beberapa strain mencit, diketahui bahwa Mencit Swiss memiliki beberapa keunggulan dibanding strain mencit yang lain. Keunggulan Mencit Swiss tersebut adalah :

- a. Cukup sensitif terhadap infeksi parasit.
- b. Relatif lebih tahan lama terhadap infeksi *Plasmodium berghei* dibanding mencit lain walaupun tidak diobati.
- c. Mudah dipelihara dan ditenakkan.

B. KERANGKA BERPIKIR



Keterangan: - - - → menghambat

C. HIPOTESIS

Terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* memiliki efek menghambat ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* ANKA.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

B. Lokasi Penelitian

Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Terpadu (berbasis molekuler) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan serbuk *Lumbricus rubellus* dengan merk "Kaicing", produk dari Dawa'aul Yaum Surakarta dalam bentuk kapsul. Sedangkan sampel *Plasmodium berghei* ANKA didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

D. Hewan Uji

Mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Mencit Swiss 30 ekor didapatkan dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

E. Teknik Sampling

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian diambil secara *Purposive Sampling*, dengan restriksi sebagai berikut:

1. Jenis mencit : Mencit Swiss
2. Umur mencit : 3 bulan
3. Berat badan mencit : 20-30 gram
4. Jenis kelamin mencit : Jantan

F. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas :
 - a. Klorokuin
 - b. Serbuk *Lumbricus rubellus*
 - c. *Plasmodium berghei* ANKA
2. Variabel Tergantung:

Ekspresi gen ICAM-1
3. Variabel Perancu (*Confounding Factor*) :
 - a. Dapat dikendalikan :
 - 1) Spesies mencit
 - 2) Umur mencit
 - 3) Suhu ruangan
 - 4) Infeksi sekunder
 - 5) Stres mencit

6) Ketelitian pengamatan

b. Tidak dapat dikendalikan :

1) Variasi genetik

2) Metabolisme mencit

G. Definisi Operasional Variabel

1. Klorokuin

Klorokuin tablet ditentukan dosisnya dengan dikonversikan terhadap berat badan mencit.

Hari I : $600 \text{ mg klorokuin} \times 0.0026 = 1.56 \text{ mg}$

Hari II : $600 \text{ mg klorokuin} \times 0.0026 = 1.56 \text{ mg}$

Hari III : $300 \text{ mg klorokuin} \times 0.0026 = 0.8 \text{ mg}$

(0,0026 merupakan angka konversi berat badan manusia 70 kg terhadap berat badan mencit) (lampiran 1).

Klorokuin diencerkan dengan aquadest ($1.56 \text{ mg}/250 \text{ } \mu\text{l}$ aquades), diberikan per oral dengan sonde (Wijayanti *et al.*, 2003). Skala variabel: rasio.

2. Serbuk *Lumbricus rubellus*

Serbuk *Lumbricus rubellus* yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan produk dari Dawa'aul Yaum, Surakarta dalam bentuk kapsul @ 200 mg. Dosis serbuk cacing ditentukan dengan cara dikonversikan terhadap berat badan mencit. Dosis didasarkan pada

perhitungan dosis manusia yaitu 3000 mg, 4000 mg, 5000 mg. Dosis yang akan diterapkan tersebut selanjutnya dikonversi ke dosis mencit yang dikalikan 0.0026 (konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg) (Wijayanti *et al.*, 2003).

Kelompok III dan IV : $3000 \text{ mg} \times 0.0026 = 7.8 \text{ mg}$

Serbuk diseduh dengan air panas $\pm 80^{\circ} \text{C}$ dan diberikan kepada mencit secara peroral menggunakan sonde. Skala variabel : rasio.

3. *Plasmodium berghei* ANKA

Sampel *Plasmodium berghei* ANKA didapatkan dari Laboratorium Parasitologi UGM berupa parasit stadium aseksual (stadium eritrositik) yang dipelihara dalam 1 ekor mencit Swiss. Darah diambil setelah parasitemia mencapai 30-40% ($\pm 10^7$ parasit/ml). Selanjutnya parasit dikultur pada 5 ekor mencit donor untuk memperbanyak sampel. Setelah parasitemia pada 5 ekor mencit donor tersebut mencapai 30-40% ($\pm 10^7$ parasit/ml), maka darah mencit tersebut digunakan sebagai sumber pembuatan inokulum. Skala variabel: rasio.

4. Gen ICAM-1

mRNA ICAM-1 diambil dari organ limpa. Selanjutnya dilakukan RT-PCR, PCR dan elektroforesis (mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Engel *et al.*, 2000). Hasil yang didapat dari elektroforesis kemudian diolah lagi yaitu menggunakan INH *software*. Hasil terakhir

berupa gambaran ekspresi gen ICAM-1 dalam bentuk semikuantitatif.

Skala variabel : rasio.

5. Variabel perancu

Jenis mencit : Mencit Swiss

Umur mencit : 3 bulan

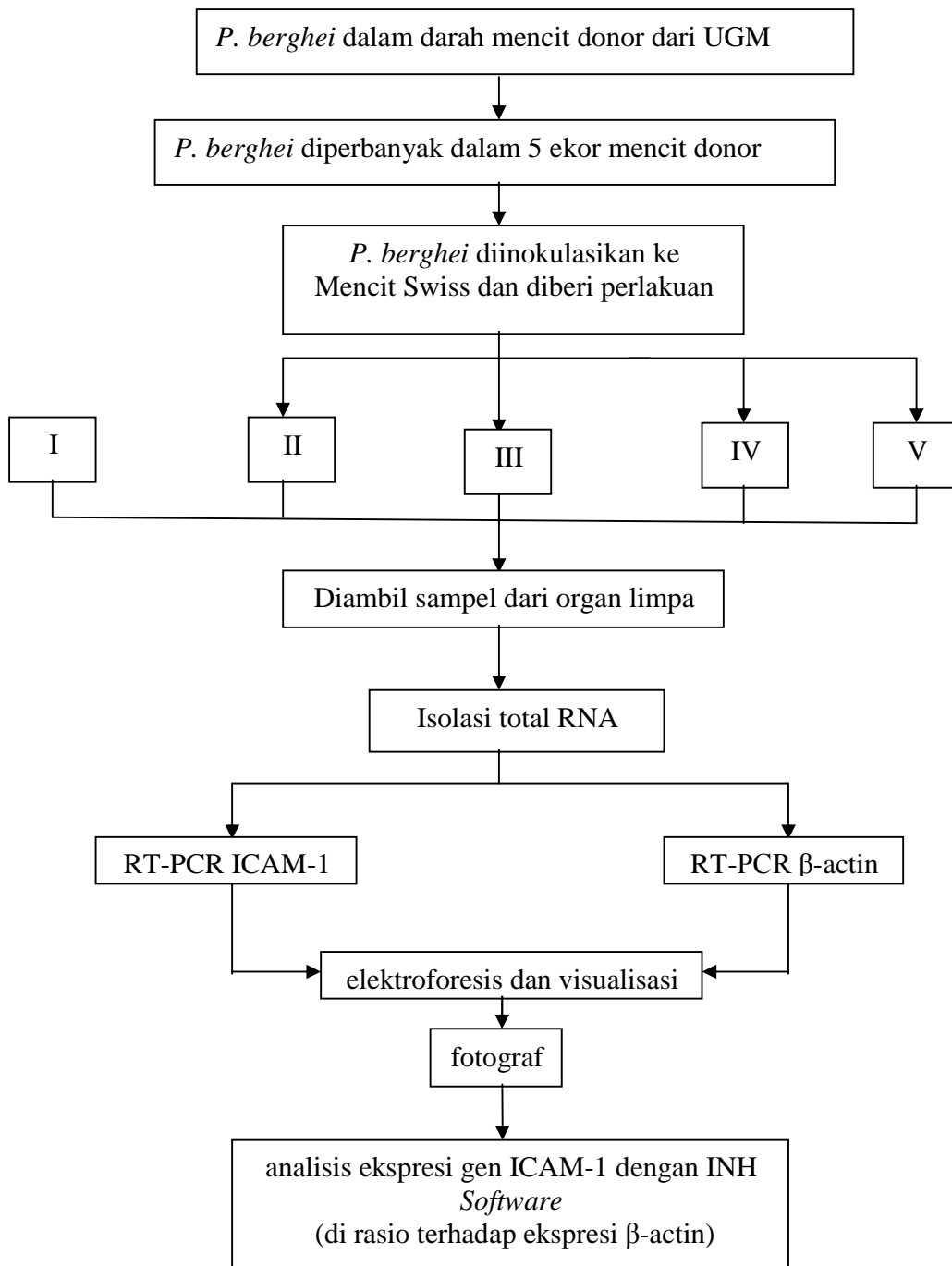
(Keduanya dikendalikan dengan restriksi pada waktu pengambilan sampel).

Suhu ruangan: Dijaga suhu ruangan sekitar 27° C

Infeksi sekunder oleh organisme selain *Plasmodium berghei* dicegah dengan tindakan yang aseptik pada saat inokulasi dan pada waktu terapi per oral. Selain itu juga dengan menjaga kebersihan kandang mencit. Stres mencit dikendalikan dengan adaptasi mencit sebelum pemberian perlakuan.

H. Rancangan (Desain Penelitian)

Desain Penelitian ini adalah *Randomized Controlled Trial* (RCT) dengan variasi *Completely Randomized Experiment Design* .



Keterangan :

Kelompok I : Tanpa perlakuan

Kelompok II : Infeksi *Plasmodium berghei* ANKA tanpa terapi

Kelompok III : Infeksi *Plasmodium berghei* ANKA dengan terapi klorokuin

Kelompok IV : Infeksi *Plasmodium berghei* ANKA dengan terapi klorokuin
dan serbuk *Lumbricus rubellus*

Kelompok V : Infeksi *Plasmodium berghei* ANKA dengan terapi serbuk
Lumbricus rubellus

I. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Pemeliharaan mencit : kandang mencit, ram kawat, alas kandang, tempat makanan, tempat minuman, sikat.
- b. Perlakuan pada mencit : gunting tajam, gelas objek, spuit 3 ml, spuit 1 ml, jarum suntik ukuran 22, mikroskop binokuler, minyak emersi, pipet tetes, kanula/sonde, stereofoam, timbangan digital Ohaus, gelas beker, tabung flacon, porselen penggerus obat, label, tisu, lap.
- c. Pengambilan data : silinder tertutup tembus pandang, sarung tangan, gunting tajam, aluminium foil, pinset, pins fiksasi, spuit 3 ml dan jarum suntik ukuran 22.
- d. PCR : Mesin thermal Cycler, Tabung ependorf 0,2 ml atau 1,5 ml, Pipetor atau Pipetman, Tip Pipet, Vortex, Mesin Sentrifugasi, Rak,

Handscoen

- e. Satu set alat elektroforesis
- f. Analisis data : *INH software*

2. Bahan

- a. *Plasmodium berghei* ANKA
- b. Serbuk klorokuin difosfat
- c. Serbuk cacing tanah *Lumbricus rubellus*
- d. Pakan mencit (pelet BR-1)
- e. RPMI 1640 (zat pengencer)
- f. Eter
- g. Heparin
- h. Cat giemsa
- i. Minyak emersi
- j. PBS formalin 10%
- k. Reagen TRIzol
- l. Kloroform
- m. Alkohol 70%
- n. Ethanol 70%
- o. Larutan SDS 0,5%
- p. Deoxynucleoside triphosphates (dNTP)
- q. Buffer PCR (10mM Tris, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatin, 0,01 NP40, 0,01% Tween 20, 0,01% Triton X-100)

- r. Dietilpirokarbonat
- s. DDW (De-ionized Distilled Water)
- t. Mineral oil
- u. Antikoagulan EDTA
- v. Air mineral kemasan
- w. Taq polymerase
- x. Oligonukleotida (primer)
- y. Buffer TE
- z. Ethidium bromide (10 mg/ml)
- aa. Agarose
- bb. DNA ladder
- cc. Loading dye
- dd. 1 pasang primer gen ICAM-1
- ee. 1 pasang primer β -actin

J. Cara Kerja

1. Kultur *Plasmodium berghei* ANKA *in vivo* (perbanyak parasit)

- a. Darah donor sebanyak ± 1 ml (dari seekor mencit donor dari UGM) yang mengandung $\pm 10^7$ parasit diinokulasikan terhadap 5 ekor mencit donor, masing-masing 0,2 ml secara intra peritoneal.

- b. Diamati derajat parasitemia mulai hari ke-3 *post* infeksi. Darah yang diambil dengan memotong ujung ekor mencit.
 - c. Setelah derajat parasitemia mencapai 30-40% (5 hari *post* infeksi), mencit dimatikan dengan inhalasi eter.
 - d. Mencit diletakkan pada stereofom, kemudian dibuka kulitnya di bagian abdomen dan thorak, dibuka diafragmanya, perhatikan jantung yang masih berdenyut.
 - e. Dilakukan *cardiac puncture* terhadap ventrikel sinister dengan spuit 3 ml dan *needle* ukuran 22.
 - f. Didapatkan masing-masing 1,2-1,5 ml darah mencit donor yang mengandung *Plasmodium berghei* ANKA, kemudian dimasukkan ke tabung reaksi dengan heparin. Perbandingan darah dan heparin adalah 90%: 10%.
 - g. Semua darah dicampur untuk homogenisasi jumlah parasit.
 - h. Darah diinokulasikan menggunakan spuit 1 ml dan *needle* ukuran 22 pada mencit uji masing-masing 0,2 ml secara intraperitoneal.
2. Perlakuan terhadap Mencit
- Pemberian perlakuan berbeda-beda sesuai kelompok :
- Kelompok I : tanpa perlakuan
- Kelompok II : tanpa terapi (hanya infeksi *Plasmodium berghei* ANKA)

Kelompok III : diterapi dengan klorokuin per oral menggunakan sonde, dosis 1.56 mg pada hari pertama dan kedua *post* infeksi, kemudian 0.8 mg pada hari ketiga *post* infeksi

Kelompok IV : diterapi dengan klorokuin dengan dosis sama seperti kelompok III dan serbuk *Lumbricus rubellus* per oral menggunakan sonde, dosis 7.8 mg mulai hari pertama *post* infeksi.

Kelompok V : diterapi dengan serbuk *Lumbricus rubellus* per sonde dosis 7,8 mg.

3. Penentuan parasitemia

Diperiksa dengan membuat sediaan apus darah tipis dari ujung ekor setiap hari dari hari kedua sampai hari kelima.

- a. Darah diambil dari ujung ekor mencit
- b. Diteteskan pada gelas obyektif, diapus dengan gelas obyektif yang lain, dikeringkan pada suhu kamar
- c. Digenangi giemsa \pm 45 menit, dicuci pada air mengalir, dikeringkan pada suhu kamar
- d. Diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000X dengan minyak emersi. Pemeriksaan pada lapangan pandang yang mengandung \pm 200 eritrosit, dengan susunan tidak menumpuk, dihitung eritrosit terinfeksi parasit per 1000 eritrosit.

4. Pengambilan sampel limpa

- a. Setelah derajat parasitemia mencit uji mencapai 30-40% (\pm 6 hari), mencit semua kelompok dimatikan dengan cara diletakkan dalam wadah tertutup yang sudah ditetesi eter.
- b. Mencit diletakkan terlentang dan difiksasi.
- c. Kulit perut dibuka, limpa diambil dan dipotong 100 mg untuk diisolasi RNAny.

5. Pemeriksaan ekspresi gen ICAM-1 dan β -actin

a. Ekstraksi RNA

1) Homogenasi

Homogenasi dilakukan dengan menggunakan 1 ml reagen TRIzol untuk 100 mg jaringan dan memakai *power homogenizer*. Volume sampel tidak boleh lebih dari 10% volume reagen TRIzol yang digunakan. Homogenisasi dengan kecepatan tinggi selama \pm 10 detik 3x sampai seluruh jaringan hancur.

2) Fase Separasi

- a) Sampel yang sudah dihomogenasi diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruangan agar kompleks Nukleoprotein terdisosiasi secara sempurna.
- b) Kloroform sebanyak 0,2 ml dimasukkan ke dalam tabung.

- c) Tabung ditutup dengan kencang dan dikocok secara kuat selama 15 detik.
- d) Tabung diinkubasi pada suhu ruangan selama 3 menit.
- e) Sentrifugasi sampel dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 menit pada suhu 2⁰ C.
- f) Selama sentrifugasi, campuran akan terpisah menjadi berwarna merah pada bagian bawah, fase fenol-kloroform, interfase, dan paling atas adalah aqueous yang tidak berwarna. Volume dari fase aqueous sekitar 60% dari total volume TRIzol yang digunakan untuk homogenisasi.

3) Presipitasi RNA

- a) Fase aqueous dipindahkan ke tabung yang baru.
- b) Presipitasi RNA dari fase aqueous dengan mencampurkannya dengan isopropil alkohol menggunakan vortex.
- c) Isopropil alkohol yang digunakan sebanyak 0,5 ml. Sampel diinkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 10 menit pada suhu 2⁰ C.
- d) Presipitat RNA sering terlihat sebelum sentrifugasi, bentuknya gel seperti pelet pada tepi dan dasar tabung.

4) Pencucian RNA

- a) Supernatan diambil.

b) Pelet RNA dicuci sekali dengan etanol 75% 1 ml. Sampel diaduk dan disentrifugasi dengan kecepatan 7500 x g selama 5 menit pada suhu 2⁰ C.

c) Ulangi langkah-langkah diatas sekali lagi.

5) Pelarutan kembali RNA

a) Pelet RNA dikeringkan selama 5 menit dengan membiarkannya di udara. Larutkan dalam buffer TE 20 µl dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55⁰ C.

b) Penentuan konsentrasi RNA.

b. RT-PCR

Karena hanya DNA saja yang dapat dipakai pada PCR, maka mRNA yang ada harus diubah dulu menjadi cDNA dengan proses *Reverse Transcript* sebelum PCR dilakukan.

Langkah-langkah dalam *Reverse Transcript* adalah sebagai berikut:

- 1) Komponen-komponen berikut dicampur dalam tabung Eppendorf :
 - a) mRNA yang akan diamplifikasi: 100 ng RNA total
 - b) Primer : 50 pmol primer antisense
 - c) dNTP : masing-masing 500 µM
 - d) 1x buffer PCR enzim transkriptase balik
 - e) Penghambat RNase: 5 unit
 - f) DEPC untuk membuat volume akhir menjadi 20 µl.

- 2) Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 1 jam

Setelah *Reverse Transcript* selesai, PCR dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- 1) Tempat untuk PCR dan mikropipet dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70%.
- 2) Peralatan yang diperlukan disiapkan : *Ice box*, tip (steril), mikropipet 10 µl dan 200 µl, tabung PCR (0,2 ml)
- 3) *Solution* yang akan digunakan disiapkan, terdiri atas DNA template, PCR Kit dan primer.
 - a) PCR Kit yang digunakan adalah 2XPCR Master Mix *Solution* (*i*-Taq) dari Roche dengan nama IntrON's, yang mengandung:
 - (1) *i*-Taq TM DNA Polymerase (5U/µL)
 - (2) dNTPs *mixture*
 - (3) Buffer reaksi
 - b) Primer ICAM-1 dengan sekuen sense: 5'-TTC CGC TAC CAT CAC CGT GTA TTC -3' dan antisense: 5'- CTG GCC TCG GAG ACA TTA GAG AAC -3', dan primer β-actin dengan sekuen sense: 5'-CCA GAG CAA GAG AGG CAT CC-3' dan antisense: 5'-GTG GTG GTG AAG CTG TAG CC-3'.

- 4) Langkah-langkah PCR untuk ICAM-1 adalah sebagai berikut :
- a) Larutan 2XPCR Master Mix 25 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
 - b) DNA template 1 μ l dan primer sense 1 μ l, antisense 1 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
 - c) Superscript 2 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
 - d) DDW (*De-ionized Distilled Water*) 20 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
 - e) *Pipetting* dilakukan secara perlahan dengan menggunakan mikropipet 100 μ l, jangan sampai terbentuk gelembung udara
 - f) Mineral Oil 1 tetes ditambahkan untuk mencegah penguapan selama proses PCR.
 - g) Sampel pada mesin PCR dan diamplifikasi dengan kondisi sebagai berikut :

<i>Denaturation</i>	94 ⁰ C (15'')	} 35 siklus
<i>Annealing</i>	60 ⁰ C (1')	
<i>Extention</i>	68 ⁰ C (1')	
<i>Extra Extention</i>	68 ⁰ C (5')	

- h) Setelah PCR selesai, sampel hasil PCR kemudian disimpan dalam lemari es 4⁰ C sebelum kemudian di-*loading* pada Agarose Gel Elektroforesis untuk visualisasi DNA yang terbentuk.

5) Langkah-langkah PCR untuk β -actin adalah sebagai berikut :

- a) Larutan 2XPCR Master Mix 25 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
- b) DNA template 1 μ l dan primer sense 1 μ l, antisense 1 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
- c) Superscript 2 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
- d) DDW (*De-ionized Distilled Water*) 20 μ l dimasukkan ke dalam tabung PCR.
- e) *Pipetting* dilakukan secara perlahan dengan menggunakan mikropipet 100 μ l, jangan sampai terbentuk gelembung udara.
- f) Mineral Oil 1 tetes ditambahkan untuk mencegah penguapan selama proses PCR.
- g) Sampel dimasukkan pada mesin PCR dan diamplifikasi dengan kondisi sebagai berikut :

<i>Denaturation</i>	94 ⁰ C (15'')	} 35 siklus
<i>Annealing</i>	60 ⁰ C (1')	
<i>Extention</i>	72 ⁰ C (1')	
<i>Extra Extention</i>	68 ⁰ C (5')	

- h) Setelah PCR selesai, sampel hasil PCR kemudian disimpan dalam lemari es 4⁰ C sebelum kemudian di-*loading* pada Agarose Gel Elektroforesis untuk visualisasi DNA yang terbentuk.

6) PCR masing-masing kelompok dilakukan sebanyak 3 kali.

c. Elektroforesis

Untuk analisis semikuantitatif , 15 μ L dari tiap produk PCR di-*running* pada 1,5% agarose gel, dengan staining ethidium bromide dan dibuat foto.

1) Persiapan agar

- a) Buffer 1XTBE sebanyak 200 ml disiapkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 600 ml
- b) Agarose ditimbang sebanyak 0,2 gr
- c) Agarose dimasukkan ke dalam buffer TBE
- d) Dipanaskan di microwave oven pada suhu 90-100⁰ C, secara berkala gelas digoyang-goyangkan
- e) Setelah mendidih , agar didinginkan pada suhu ruangan
- f) Saat suhu mulai dingin, 20 μ l SYBR ditambahkan ke dalam campuran dan digoyang-goyangkan

2) Persiapan pembuatan gel

- a) Peralatan pembuatan gel dan sisir yang akan digunakan disiapkan
- b) Sisir dipasang ke dalam bak pembuatan gel
- c) Campuran agar dituangkan ke dalam bak sampai sedikit di atas pangkal jari-jari sisir
- d) Agar dibiarkan menjendal menjadi gel di suhu ruangan

3) Persiapan elektroforesis

- a) Persiapan alat-alat elektroforesis (bak, penutup, kabel daya)
- b) Gel ditempatkan pada wadahnya di bak elektroforesis
- c) Buffer 0.5XTBE (sebagai buffer elektroforesis) dituangkan sampai sedikit di atas permukaan gel (sekitar 300 mL buffer 0.5 XTBE)
- d) Kabel disambungkan sesuai kutubnya, set voltase dari durasi waktu sesuai target
- e) Daya dinyalakan untuk melihat bahwa alat bekerja dengan baik. Tandanya : timbul gelembung pada kutub negatif (hitam) yang bergerak ke atas dan menuju ke kutub positif
- f) Setelah alat dipastikan, daya listrik dimatikan lagi.

4) Persiapan *loading* sampel

- a) Persiapan tabung-tabung kecil, isi dengan sampel 5 μL (produk PCR) + 1 μL *loading dye*
- b) Ladder DNA (DNA marker) disiapkan sebanyak 5 μL + 1 μL *loading dye*
- c) Marker dan sample dimasukkan, mulai dari lubang paling kiri untuk marker, dan berturut-turut ke kanan sample no 1, 2, 3, dst
- d) Setelah semua sampel terisikan, bak elektroforesis ditutup dengan penutup

- e) Sambungan kabel daya dipasang kembali
- f) Daya dinyalakan, dilihat timbulnya gelembung seperti saat mencoba sebelum dipakai
- g) Setelah timbul gelembung, berarti proses elektroforesis sudah berjalan
- h) Suhu elektroforesis diperhatikan, kalau panas meninggi dan timbulnya gelembung perlahan, harus diturunkan voltasenya
- i) Sampel akan bergerak, dengan indikator pergerakan *loading dye*
- j) Setelah *loading dye* bergerak cukup mendekati kutub positif, elektroforesis dihentikan

5) Persiapan pengambilan hasil

- a) Gel diambil dari bak elektroforesis
- b) Ditempatkan pada tempat pemotretan
- c) Lampu UV dinyalakan
- d) Posisi gel diatur pada posisi yang tepat
- e) Setelah tercapai posisi yang tepat, gambar diambil dengan kamera digital

d. Analisis ekspresi gen

Fotograf hasil PCR tersebut di-*scanning* dengan *INH software*.

Untuk setiap sampel, produk dari PCR tersebut dibandingkan terhadap

ekspresi β -actin mRNA sehingga didapatkan nilai yang akurat dan *valuable* dari produk PCR tersebut.

K. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *Anova* dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test* untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok. Jika data tidak memenuhi syarat untuk uji *Anova*, sebaran data tidak normal ($p < 0,05$) dan varians data tidak sama meskipun sudah ditransformasi, digunakan uji alternatifnya yaitu uji *Kruskal-Wallis* untuk membandingkan perbedaan *mean* lebih dari dua kelompok. Dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*, untuk membandingkan perbedaan mean antar kelompok menggunakan program *SPSS for Windows Release 16.0*.

BAB IV

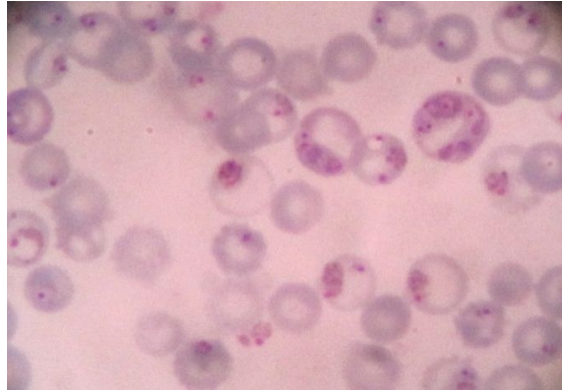
HASIL PENELITIAN

A. Data Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Biomedik Terpadu Fakultas Kedokteran UNS pada bulan Oktober- Desember 2009 dengan 30 mencit yang dibagi dalam 5 kelompok. Pada tanggal 16 Oktober 2009, hewan coba diinfeksi dengan 0,2 ml darah mencit donor yang mengandung *Plasmodium berghei* ANKA ($\pm 10^7$ parasit/ ml) secara injeksi intraperitoneal. Selanjutnya hewan coba diterapi sesuai dengan yang tertulis pada metodologi penelitian.

Derajat parasitemia *Plasmodium berghei* pada eritrosit mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA mulai diperiksa hari kedua *post* infeksi sampai hari dimana limpa mencit diambil. Pemeriksaan derajat parasitemia dilakukan dengan cara memeriksa apusan darah tipis yang diambil dari ujung ekor mencit. Preparat apusan darah tipis selanjutnya dicat dengan giemsa kemudian diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000 x.

Gambaran apusan darah tipis yang tampak adalah sebagai berikut :



Gambar 3. Gambar apusan darah tipis dengan pewarnaan giemsa yang diambil dari sampel darah mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA

Dari hasil penghitungan maka rata-rata derajat parasitemia untuk setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Data parasitemia mencit

Hari Ke-	Kelompok perlakuan			
	Kelompok II (kontrol positif)	Kelompok III (klorokuin)	Kelompok IV (klorokuin+ <i>L. rubellus</i>)	Kelompok V (<i>L. rubellus</i>)
2	19,18%	9,90%	6,40%	31,53%
3	35,78%	8,23%	5,79%	48,20%
4	50,20%	7,84%	5,53%	49,76%
5	68,54%	7,03%	5,61%	51,52%

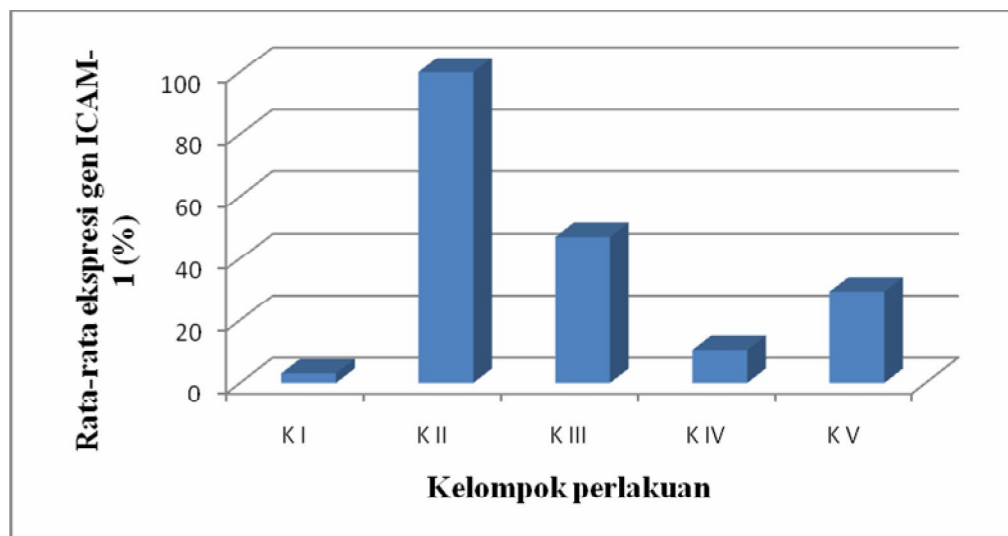
Pada hari ke-5 *post* infeksi yaitu pada saat derajat parasitemia kelompok II (terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA) sudah mencapai \pm 30-40%, limpa mencit diambil untuk diisolasi RNA dan dianalisis dengan menggunakan RT-PCR. Setelah dielektroforesis, hasilnya dianalisis secara semikuantitatif dengan menggunakan *INH software*, dirasio terhadap ekspresi β -actin.

Hasil penghitungan ekspresi gen ICAM-1 dengan INH *software* dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil penghitungan ekspresi gen ICAM-1

Kelompok	PCR 1 (%)	PCR 2 (%)	PCR 3 (%)	Rata-rata (%)
I	4	2	3	3
II	100	100	100	100
III	53	41	47	47
IV	13	8	11	10,67
V	30	29	29	29.33

Hasil rata-rata penghitungan ekspresi gen ICAM-1 tiap kelompok digambarkan dengan grafik dibawah ini :



Grafik 1. Grafik Rata-rata Hitung Ekspresi Gen ICAM-1 Mencit

Keterangan :

K I : kontrol, tanpa perlakuan

K II : tanpa terapi (hanya infeksi *Plasmodium berghei* ANKA)

K III : diterapi dengan klorokuin per oral menggunakan sonde, dosis 1.56 mg pada hari pertama dan kedua *post* infeksi, kemudian 0.8 mg pada hari ketiga *post* infeksi

K IV : diterapi dengan klorokuin dengan dosis sama seperti kelompok III dan serbuk *Lumbricus rubellus* per oral menggunakan sonde, dosis 7.8 mg mulai hari pertama *post* infeksi

K V : diterapi dengan serbuk *Lumbricus rubellus* per sonde dosis 7,8 mg.

B. Analisis Data

Data tidak memenuhi syarat untuk uji *Anova* karena meskipun varians data sama tetapi sebaran data tidak normal ($p < 0,05$) meski sudah ditransformasi, sehingga data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji alternatifnya, yaitu *Kruskal-Wallis* untuk membandingkan perbedaan *mean* lebih dari dua kelompok, dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok menggunakan program *SPSS for Windows Release 16.0*.

Dari hasil perhitungan statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh nilai p adalah 0.009. Jadi minimal terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan bermakna. Hasil perhitungan uji sebaran data, uji varians, dan uji *Kruskal-Wallis* selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6 dan lampiran 7.

Karena terdapat perbedaan yang bermakna diantara lima kelompok sampel, maka uji statistik dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Data hasil perhitungan

dengan uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada tabel 4.3. Data selengkapnya mengenai perhitungan uji *Mann-Whitney* dengan program *SPSS For Windows Release 16.0* dapat dilihat pada lampiran 7.

Tabel 4.3. Hasil perhitungan dengan uji *Mann-Whitney*

Kelompok	Nilai p ($\alpha=0,05$)	Kemaknaan
K I -- K II	0,037	Signifikan
K I – K III	0,05	Tidak signifikan
K I – K IV	0,05	Tidak signifikan
K I – K V	0,046	Signifikan
K II -- K III	0,037	Signifikan
K II -- K IV	0,037	Signifikan
K II -- K V	0,043	Signifikan
K III -- K IV	0,05	Tidak signifikan
K III -- K V	0,046	Signifikan
K IV -- K V	0,046	Signifikan

Keterangan :

K I : kontrol, tanpa perlakuan

K II : tanpa terapi (hanya infeksi *Plasmodium berghei* ANKA)

K III : diterapi dengan klorokuin per oral menggunakan sonde, dosis 1.56 mg pada hari pertama dan kedua *post* infeksi, kemudian 0.8 mg pada hari ketiga *post* infeksi

K IV : diterapi dengan klorokuin dengan dosis sama seperti kelompok III dan serbuk *Lumbricus rubellus* per oral menggunakan sonde, dosis 7.8 mg mulai hari pertama *post* infeksi

K V : diterapi dengan serbuk *Lumbricus rubellus* per sonde dosis 7,8 mg.

BAB V

PEMBAHASAN

Pada penelitian tentang efek terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen ICAM-1 ini, peneliti menggunakan sampel dari organ limpa karena organ limpa mempunyai peran penting dalam mengatasi infeksi malaria (*clearance*). ICAM-1 sebagai molekul adhesif pada sel endotel memegang peran penting dalam proses *cytoadherence* yang merupakan mekanisme pertahanan diri dari *Plasmodium* untuk menghindari proses *clearance*. Hal ini menyebabkan *cytoadherence* banyak terjadi pada pembuluh darah limpa (Mohanty *et al.*, 2006).

Limpa diambil pada saat derajat parasitemia kelompok II sebagai kontrol positif telah mencapai 30-40%. Derajat parasitemia ini menunjukkan tingkat infeksi *Plasmodium berghei* ANKA pada mencit tiap 1000 eritrosit. Apabila derajat parasitemia sudah mencapai lebih dari 40%, mencit banyak yang mengalami kematian karena berbagai komplikasi malaria (Wardahani, 2007). Tetapi pada penelitian ini, mencit dapat bertahan sampai derajat parasitemia mencapai lebih dari 60% (tabel 4.1). Hal ini dimungkinkan karena reaksi individual terhadap infeksi *Plasmodium berghei* ANKA tidak sama. Ada berbagai faktor yang mempengaruhi, seperti variasi genetik, metabolisme, dan sistem imun masing-masing mencit (Miller *at al.*, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian, terdapat perbedaan ekspresi gen ICAM-1 yang signifikan antara kelompok yang mendapat terapi kombinasi antara klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* dengan kelompok tanpa terapi dan kelompok dengan pengobatan tunggal serbuk *Lumbricus rubellus* (**tabel 4.3**). Terapi kombinasi ini juga memberikan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan terapi klorokuin secara tunggal (walaupun dengan perbedaan yang tidak signifikan) (**tabel 4.2**). Hal ini disebabkan karena pada kelompok dengan terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terjadi efek yang saling sinergis antara terapi terhadap kausa (oleh klorokuin) dan terapi terhadap gejala klinik (oleh serbuk *Lumbricus rubellus*). Klorokuin akan mengakibatkan kematian parasit karena toksisitas heme bebas (Amir dan Zunilda, 2007). Sedangkan serbuk *Lumbricus rubellus* mengandung Lumbricin I sebagai antimikroba (Cho *et al.*, 1998), Lumbofebrin yang berguna sebagai antipiretik (Sajuthi *et al.*, 2003) dan Lumbrokinase sebagai fibrinolitik (Mihara *et al.*, 1991), serta antiinflamasi (Noda *et al.*, 1992).

Efek positif yang diperlihatkan oleh *Lumbricus rubellus* ini kemungkinan besar disebabkan karena kandungan enzim fibrinolitik yang dimiliki oleh *Lumbricus rubellus* yang disebut Lumbrokinase (Mihara *et al.*, 1991). Telah disebutkan dalam landasan teori bahwa malaria oleh *Plasmodium berghei* mempunyai gejala klinik yang mirip dengan malaria falciparum pada manusia diantaranya dapat menyebabkan komplikasi yang mematikan karena adanya *cytoadherence*, sekuestrasi dan *rosetting* pada kapiler organ dalam misalnya limpa, paru dan hepar (Lou *et al.*, 2001). Ekspresi ICAM-1 inilah yang berperan dalam

proses *cytoadherence* dan *rosetting* pada infeksi malaria. *Cytoadherence* dan *rosetting* pada akhirnya akan menimbulkan sumbatan pembuluh darah kapiler/venula yang menyebabkan kerusakan pada organ-organ yang divaskularisasi (Biggs dan Brown, 2001). Lumbrokinase yang terkandung dalam serbuk *Lumbricus rubellus* akan menghidrolisis gumpalan fibrin dan trombus intravaskular sehingga tidak terjadi komplikasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mihara *et al.* (1991), Lumbrokinase dapat menghidrolisis fibrin kaya plasminogen, maupun fibrin bebas plasminogen, sehingga dapat disimpulkan bahwa Lumbrokinase bekerja sebagai perangsang plasminogen dan sekaligus dapat mencerna fibrin secara langsung. Ekspresi ICAM-1 pada sel endotel akan meningkat dengan adanya sitokin proinflamasi *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *interleukin-1* (IL-1), dan *interferon- γ* (IFN- γ) (Ho dan White, 1999). Pada terapi yang menggunakan serbuk *Lumbricus rubellus*, kerja sitokin-sitokin proinflamasi ini dihambat oleh antiinflamasi yang dimiliki oleh *Lumbricus rubellus* (Noda *et al.*, 1992). Dengan dihambatnya kerja TNF- α , IL-1, serta IFN- γ ini, maka ekspresi gen ICAM-1 juga dapat ditekan.

Walaupun terapi serbuk *Lumbricus rubellus* secara tunggal juga memberikan perbedaan ekspresi gen ICAM-1 pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok-kelompok yang lain (**tabel 4.3**), penggunaan serbuk *Lumbricus rubellus* pada terapi malaria secara tunggal tidaklah dianjurkan. Hal ini mengacu pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Wardhani (2007), bahwa serbuk *Lumbricus rubellus* tidak mempunyai efek

antiplasmodium sehingga menceit malaria yang hanya diterapi dengan serbuk *Lumbricus rubellus* saja tidak memiliki masa hidup sepanjang menceit yang diterapi dengan klorokuin. Ini menunjukkan bahwa klorokuin masih merupakan obat pilihan yang tepat untuk malaria, sedangkan serbuk *Lumbricus rubellus* hanya bersifat sebagai *adjuvant* (tambahan) saja dalam terapi malaria, khususnya malaria serebral.

Sebelumnya terapi *adjuvant* pada malaria serebral menggunakan beberapa macam obat yang penggunaannya pun masih menimbulkan kontroversi karena memiliki efek samping yang berbahaya. Misalnya menggunakan heparin. Meskipun heparin memiliki fungsi antikoagulan dan trombositopenia yang dapat menurunkan jumlah platelet pada pasien malaria, heparin sering menyebabkan terjadinya perdarahan. Hal inilah yang menyebabkan heparin tidak direkomendasikan penggunaannya secara rutin pada terapi malaria (Mohanty *et al.*, 2006). Berbeda dengan *Lumbricus rubellus* yang sejauh ini penggunaannya belum memberikan efek samping yang berarti.

Selain heparin, terapi pada malaria serebral juga bisa memakai zat osmotik seperti manitol, glycerol, dan sorbitol. Manitol digunakan untuk mengurangi oedem pada otak sehubungan dengan malaria serebral dan dapat mengurangi viskositas darah. Tetapi pada penggunaan yang berlebihan, manitol dapat terakumulasi di otak dan dapat menimbulkan komplikasi sistemik seperti gagal jantung kongestif, hiperkalemi, dan nekrosis tubular akut (Mohanty *et al.*, 2006).

Pemberian klorokuin pada kelompok III juga bisa menekan ekspresi gen ICAM-1. Akan tetapi pada kenyataannya di lapangan, pasien yang hanya diterapi obat antimalaria masih tetap mengalami komplikasi serebral malaria (Munthe, 2001 ; Pongponrat *et al.*, 2000). Hal ini kemungkinan karena klorokuin hanya efektif terhadap parasit dalam fase eritrosit, sama sekali tidak efektif terhadap parasit di jaringan (Amir dan Zunilda, 2007). Selain itu, penggunaan klorokuin juga sudah mulai mengalami resistensi terhadap strain *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* (Mohanty *et al.*, 2006).

Pada kelompok I (kontrol negatif) ekspresi gen ICAM-1 tetap terlihat. Hal ini disebabkan karena reseptor ICAM-1 terdapat secara konstan pada membran sel leukosit dan endotel, meskipun dengan konsentrasi yang rendah (Ho dan White, 1999).

Dari hasil pembahasan di atas, dapat dilihat bahwa pemberian terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* dapat menghambat ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA secara signifikan dan memberikan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan terapi klorokuin atau serbuk *Lumbricus rubellus* secara tunggal. Hal ini membuktikan bahwa *Lumbricus rubellus* merupakan pilihan yang tepat sebagai terapi *adjuvant* pada malaria.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Terapi kombinasi klorokuin dan Serbuk *Lumbricus rubellus* mempunyai efek menghambat ekspresi gen ICAM-1 pada Mencit Swiss yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* ANKA secara signifikan.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan serbuk *Lumbricus rubellus* dalam pengobatan malaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Allergy Research Group. 2009. *New Enzyme Complex Isolated from Earthworms is Potent Fibrinolytic*.
<http://www.allergyresearchgroup.com/proddesc/discuss/LumbrokinaseP DFProductSheet011107.pdf>
- Amir dan Zunilda, 2007. Obat malaria. Dalam : *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. Pp: 559-561.
- Anggonowati, Krisninda. 2008. *Efek Terapi Kombinasi Klorokuin dan Tromboles Terhadap Gambaran Histopatologis Limpa Mencit (Mus musculus) yang Diinfeksi Plasmodium berghei*. Universitas Sebelas Maret Surakarta. Skripsi.
- Arocker Mettinger E, Steurer Georgiew L, Steuer M, *et al.*1992. Circulating ICAM-I levels in serum of uveitis patients. *Current Eye Res.* 11: 161-6.
- Barnwell, J.W., Asch, A.S., Nachman, R.L., Yamaya, M., Aikawa, M. dan Ingravallo, P. 1989. A Human 88-kD Membrane Glycoprotein (CD36) Functions In Vitro as A Receptor for A Cytoadherence Ligand on *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 84: 765–772.
- Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I. dan Marsh, K. 1989. Intercellular Adhesion Molecule-1 is An Endothelial Cell Adhesion Receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 341: 57–59.
- Biggs, B. A. dan Brown, G. V.,2001. Malaria. Dalam: *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. New York, John Wiley & Son.
- Carter, R. dan Diggs, C.L. 1977. Plasmodia of rodents. Dalam: *Parasitic Protozoa*, vol. III. Pp : 359-465.
- Cho, J. H.; Park, C. B.; Yoon, Y. G.; Kim, S. C. 1998. Lumbricin I, A Novel Prolinrich Antimicrobial Peptide from the Earthworm : Purification, cDNA Cloning and Molecular Characterization. *Biochim Biophys Acta.* 1408(1): 67.
- Davidson, J. E., 2007. *Raising Earthworms: Which Worms to Choose for Your Worm Farm*.
http://www.associatedcontent.com/article/454578/raising_earthworms_w

[hich_worms_to_choose_pg2.html](#) (11 Februari 2009).

Departemen Kesehatan RI, 2003. *Pedoman Tatalaksana Kasus Malaria*. Jakarta: Direktorat Jenderal. PPM&PL Direktorat Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang.

Departemen Kesehatan RI. 2004. *Penggunaan Artemisinin Untuk Atasi Malaria Di Daerah yang Resisten Klorokuin* <http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=437&Itemid=2> (19 Februari, 2009).

Dondorp, A. M., Kager, P. A., Vreeken, J. dan White, N. J. 2000. Abnormal Blood Flow and Red Blood Cell Deformability in Severe Malaria. *Parasitol. Today*. 16 : 228–232.

Dormeyer, M., Adams, Y., Kramer, B., Chakravorty, S., Tse, M., Pegoraro, S., Whittaker, L., Lanzer, M., Craig, A. 2006. Rational Design of Anticytoadherence Inhibitors for *Plasmodium falciparum* Based on the Crystal Structure of Human Intercellular Adhesion Molecule 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 724-730.

Engel, Natasa K van den, Heidenthal Edmund, Vinke Antje, Kolb Hubert, dan Stephan Martin. 2000. Circulating Forms of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Mice Lacking Membranous ICAM-1. *Blood Journal*. Pp. 1350-1355.

Enzyme Stuff. 2005. *Cancer and Enzymes*. <http://www.enzymestuff.com/conditioncancer.htm> (20 Mei 2009).

Gottsauner Wolf M, Sochor H, Probst P, Roder S, Balcke P, Stockenhuber F. 1992. Preliminary data of sICAM-I in patients with acute myocardial infarction. *Wien Med Wochenschr*. 4:7.

Graninger, W., Prada, J., Neifer, S., Zotter, G., Thalhammer, F., and Kremsner, P. G. 1994. Upregulation of ICAM-I by *Plasmodium falciparum*: in vitro and in vivo studies. *Journal of Clinical Pathology*. 47(7): 653–656.

Harijanto, P. N. 2007. Malaria. Dalam : *Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi Keempat . Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pp: 1732- 1744.

Harning R, Mainolfi E, Bystryn JC, Henn M, Merluzzi VJ, Rothlein R. 1991. Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 51:5003-5.

- Ho, May dan White, Nicholas J. 1999. Molecular Mechanism of Cytoadherence in Malaria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 276.
- Ji, H., Wang, L., Bi, H., Sun, L., Cai B., Wang, Y., Zhao J., Du, Z., 2008. Mechanisms of Lumbrokinase in Protection of Cerebral Ischemia. *European journal of pharmacology (abstract).*
- Kun, Jurgen F.J.; Klabunde, Jens; Lell, Bertrand; Luckner, Doris; Alpers, Michael; May Jurgen; Meyer, Christian; dan Kremsner, Peter G. 1999. Association of the ICAM-1^{KILIFI} Mutation with Protection Against Severe Malaria in Lambarene, Gabon. *American Journal Tropical Medicine.* Pp: 776-779.
- Kuster H dan Degitz K. 1993. Circulating ICAM-I in neonatal sepsis. *Lancet.*341:506.
- Leiden University Medical Center, 2005. *Description of The Biology of Plasmodium berghei and Comparisons Between Characteristics of P. berghei and Those of The Human parasite P. falciparum.*
<http://www.lumc.nl/1010/research/malaria/model/htm>.
- Lou, J.; Lucas, R.; Grau, G.E. 2001. Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Application for Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 810-820.
- Machold KP, Kiener HP, Graninger W, Graninger WB. 1993. Soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-I) in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 68: 74-8.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, Y., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., Maruyama, M. (1991) A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese J. Physicol.* 41: 461-472.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., Duombo, O. K. 2002. The Pathogenic Basis of Malaria. *Nature.* (415): 673-67.
- Miller, L. H., Good, Michael F., Milon, Genevieve . 1994. Malaria Pathogenesis. *Science.* 264.
- Miller, L. H., Shunichi, U. dan Chien, S. 1971. Alteration in The Theologic Properties of *Plasmodium knowlesi* Infected Red Cells. A Possible Mechanism of Cerebal Malaria. *J. Clin. Invest.* 50: 1451–1455.

- Mohanty, S., Patel, D. K., Pati S. S., Mishra, S. K. 2006. Adjuvant Therapy in Serebral Malaria. *Indian Journal of Medical. Research*. Pp: 245-260.
- Munthe, C. E. 2001. Malaria Serebral. *Cermin Dunia Kedokteran*. (131): 5.
- NIH (National Institute of Health) (2000). *Plasmodium berghei*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Malaria/Rodent/berghei.html>. (3 Maret 2009).
- Noda N., Tsunefuka S., Tanaka R., Miyahara K. 1992. *Chem Pharm Bull*. 40: 2756
- Nurachman, Zeily. 2001. *Obat Stroke dan Jantung Akibat Trombosis dari Cacing Tanah*. <http://www.mail-archive.com/zoa-biotek@sinergy-forum.net/msg00102.html> (23 April 2009)
- Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. dan Lobb, R.R. (1992) Human Vascular Endothelial Cell Adhesion Receptors for Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes: Roles for Endothelial Eukocyte Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *J. Exp. Med.*, 176: 1183–1189.
- Palungkun, R. 2008. *Sukses Beternak Cacing Tanah Lumbricus rubellus*. Jakarta: Penebar Swadaya. Pp: 5-15.
- Pongponrat, E., Turner, G.D.H., Day, N.J.P. 2000. The Discrepancy between Malaria Parasite in the Brain and Pheripheral Blood Parasitaemia. *Annual Report 2000*.
- Ristek, 2009. *Budidaya Cacing Tanah*. <http://www.smallcrab.com/kesehatan/25-healthy/91-budidaya-cacing-tanah> (19 Februari, 2009).
- Roberts, D.D., Sherwood, J.A., Spitalnik, S.L., Panton, L.J., Howard, R.J., Dixit, V.M., Frazier, W.A., Miller, L.H. dan Ginsburg, V. 1985. Thrombospondin Binds Falciparum Malaria Parasitized Erythrocytes and may Mediate Cytoadherence. *Nature*, (318): 64–66.
- Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M., Marlin SD. 1991. A form of circulating ICM-1 in human serum. *J Immunol*. 147: 3788-93
- Sajuthi, D., Suradikusumah, E., Santoso, M. A. 2003. *Efek Antipiretik*

Ekstrak Cacing Tanah. <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0305/29/ilpeng/336450.htm> (15 Februari 2009).

- Shear, Hannah L., Marino, Michael W., Wanidworanun, Chingchai, Berman, oan W., dan Nagel, Ronald L. 1998. Correlation of Increased Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1, But Not High Levels of Tumor Necrosis Factor- α , with Lethality of Plasmodium yoelii 17XL, A Rodent Model of Cerebral Malaria. *American Journal Tropical Medicine*. Pp: 852-858.
- Shijubo N, Imai K, Aoli S, et al.1992. Circulating intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-I) antigen in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 89:58-62.
- Smith, J., Craig, A., Kriek, N, Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagen, T., Pinches, R., Baruch, D., Newbold, C., Miller, L., 2000. Identification of a *Plasmodium falciparum* Intercellular Adhesion Molecule-1 Binding Domain: A Parasite Adhesion Trait Implicated in Cerebral Malaria. *The National Academy of Sciences*. 970: 1766–1771.
- Stockenhuber F, Gnant M, Gotzinger P, et al. 1992. Soluble ICAM-I in renal and liver transplant recipients. *Wien Med Wochenschr*. 4:6.
- Strickland, G. T. 1995. Malaria. Dalam: *Hunter's Tropical Diseases*. Edisi 7. Philadelphia : Harcourt Brace ovanovich, Inc. Pp: 586- 616.
- Sundari, Y., Sulaksono, E., Jekti, R. P., Subahagio. 1997. Inokulasi Plasmodium berghei pada beberapa Strain Mencit. *Cermin Dunia Kedokteran*. 118.
- Tambayong, E.H.,2000. Patobiologi Malaria dalam Harijanto P.N., (Ed) *Malaria: Epiemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganannya*, Penerbit buku kedokteran EGC.
- Wardhani, Y. F. 2007. *Efek Serbuk Cacing Lumbricus Rubellus terhadap Lama Hidup dan Derajat Parasitemia pada Mencit Swiss yang Diinfeksi oleh Plasmodium berghei*. Universitas Sebelas Maret Surakarta. Skripsi.
- Wijayanti, M.,A., Herdiana, M.E., Mardihusodo, S.Y. 2003. Efek Bee Propolis terhadap Infeksi Plasmodium berghei pada Mencit Swiss. *B.I. Ked*. 35(2) : 83- 84.