Pengaruh Pemberian Kalsium terhadap Pertumbuhan *Plasmodium falciparum in Vitro*

Verry Asfirizal[1*], Soebaktiningsih [2], Sudjari [2], Sumarno [2], Loeki E. Fitri [2]

[1] Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Mulawarman, Samarinda
[2] Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Peningkatan permeabilitas sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* terhadap ion dan makromolekul diketahui sebagai mekanisme parasit untuk memenuhi nutrisi dalam proses pertumbuhan. Peningkatan permeabilitas terhadap kalsium masih merupakan hal yang kontradiktif dalam peranannya meningkatkan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dalam sel eritrosit. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui peningkatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dalam sel eritrosit pasca pemberian kalsium. Biakan primer *Plasmodium falciparum* dalam medium biakan RPMI 1640 yang menghasilkan parasitemia 15%, dilakukan inokulasi untuk pembuatan subkultur yang menghasilkan parasitemia 2% dan dilakukan pembagian untuk kelompok perlakuan pemberian kalsium dan kontrol (ML 10%) dengan replikasi 3 kali. Pengamatan dilakukan hari pertama sampai hari ke-6 setelah perlakuan. Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan parameter parasitemia, bentuk skizon, hemolisis dan kalsium intraseluler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kalsium menghasilkan peningkatan tertinggi jumlah total rerata parasitemia (11,09 ± 4,01) (Rerata ± SD), bentuk skizon (23,52 ± 10,83), hemolisis (0,278 ± 0,03) dan kalsium intraseluler (6,55 ± 1,88), dibandingkan dengan media biakan kontrol (ML 10%). Analisis T-*test* (α= 0,05) menghasilkan perbedaan yang signifikan pada parameter parasitemia, bentuk skizon, hemolisis tetapi tidak memberikan perberbedaan yang signifikan pada parameter kalsium intraseluler.

Kata kunci: glukosa, hemolisis, kalsium, kalsium intraseluler, parasitemia, *skizon*

PENDAHULUAN

Malaria adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh protozoa obligat intraseluler dari genus *Plasmodium*. Penularan malaria dilakukan oleh nyamuk betina dari *Tribus anopheles*. Saat ini telah ditemukan sekitar 400 spesies nyamuk *Anopheles* dan telah diteliti bahwa 67 spesies dapat menularkan malaria, dari jumlah tersebut 24 spesies diantaranya ditemukan di Indonesia. Dari berbagai spesies *Plasmodium, Plasmodium falciparum* dilaporkan telah banyak menyebabkan kematian karena mempunyai masa inkubasi paling pendek, kemampuan menginfeksi paling berat dan menghasilkan parasitemia paling tinggi walaupun masa infeksinya paling pendek [1]. Konsentrasi kalsium didalam sitoplasma sangat rendah dibanding diluar sel, yaitu 0,1 µM, pada kondisi sel eritrosit yang terinfeksi parasit *Plasmodium falciparum* konsentrasi kalsium dalam sel meningkat [2]. Hal ini disebabkan peningkatan pengambilan kalsium oleh sel eritrosit karena peningkatan permeabilitas anion dan metabolit didalam sel atau untuk kebutuhan partumbuhan parasit.

Rendahnya konsentrasi kalsium intraseluler dipertahankan oleh suatu mekanisme Ca^{2+} *pump*, pada eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* fungsi dari Ca^{2+} *pump* ini sebagian besar masih normal [3]. Pada penderita malaria *Plasmodium falciparum* banyak dijumpai kondisi anemia. Anemia disebabkan adanya gangguan fragilitas sel eritrosit yang menyebabkan eritrosit lisis. Penyebab lisisnya eritrosit bersifat multifaktorial, peristiwa pelisisan eritrosit merupakan akibat respon imun dari hospes [1]. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa peningkatan konsentrasi kalsium yang menstimulasi enzim transglutaminase menyebabkan deformitas sel eritrosit yang memudahkan sel lisis [4]. Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini diamati faktor lain yang diduga dapat menyebabkan sel eritrosit lisis yaitu peningkatan pertumbuhan parasit dalam sel eritrosit dengan pemberian ion kalsium.

METODE PENELITIAN

Pengamatan Lisis Sel Eritrosit

Pemeriksaan konsentrasi hemoglobin pada larutan supernatan dilakukan dengan instrumen

* Alamat korespondensi penulis:
Verry Asfirizal
e-mail : asfirizal@yahoo.com
Alamat : Jl. Krayan Kampus Unmul Gn. Kelua
Samarinda, Kalimantan Timur, 75119

Microplate reader Birad model 550, dengan panjang gelombang yang spesifik terhadap hemoglobin yaitu 540 nm. Nilai satuan absorbansi cm M.

Perhitungan Kalsium Intraseluler dengan Pengecatan Von Kossa

Penghitungan kalsium intraseluler dengan pengecatan Von Kossa dilakukan dengan cara ditambahkan larutan silver nitrat 5% pada apusan darah tipis sampai semua permukaan hapusan tertutupi oleh larutan silver nitrat 5%. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, dihitung jumlah sel yang terdapat bercak hitam setiap 200 sel eritrosit yang diamati.

Pemeriksaan pertumbuhan *P. falciparum*

Setiap *well* dilakukan pengambilan 20 µL sel eritrosit untuk membuat hapusan darah tipis, fiksasi dengan methanol dan lakukan pewarnaan dengan Giemsa 25%. Dihitung parasitemia dengan menggunakan estimasi mikroskop yaitu persentase jumlah parasit yang menginfeksi eritrosit per 1000 jumlah eritrosit yang diamati serta penghitungan fase maturasi skizon.

Analisis Data

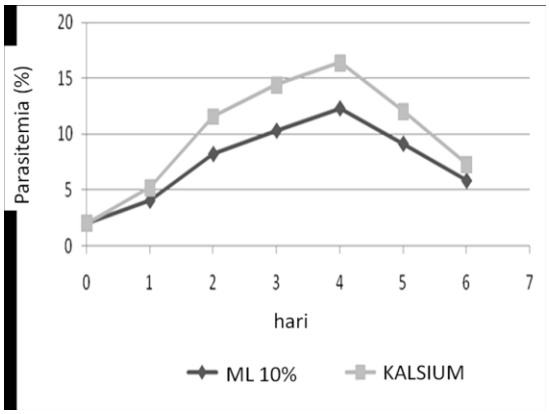
Data yang diperoleh pada kelompok perlakukan pemberian kalsium 15 µM kalsium dan kontrol (ML 10%), dianalisis perbedaan hasil pada setiap parameter yang ditentukan, yaitu parasitemia, bentuk skizon, hemolisis dan konsentrasi kalsium dengan uji beda menggunakan analisis T-*test* dengan uji beda nyata jujur pada taraf signifikansi 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Parasitemia

Berdasarkan perhitungan parasitemia pada media biakan diketahui terdapat peningkatan yang cukup tajam pada hari pertama sampai hari kedua. Pada hari ke-3 sampai ke-4 semua media mengalami peningkatan parasitemia meskipun peningkatan ini tidak setajam pada hari pertama dan hari ke-2. Pada hari ke-4 pengamatan, terjadi penurunan nilai parasitemia sampai pada hari ke-5 sampai ke-6 (Gambar 1). Peningkatan parasitemia pada perlakuan pemberian kalsium sebagai *second massenger* memberikan peningkatan parasitemia yang lebih tinggi (11,09 ± 0,38) (Rerata ± SD) dibanding dengan media biakan dasar ML 10% (8.28 ± 2,82). Secara keseluruhan terdapat perbedaan yang bermakna pada analisis T-*test* ($\alpha = 0,05$).

Peningkatan parasitemia sampai pada hari ke-4 (Gambar 1) menunjukkan bahwa kalsium berpengaruh terhadap peningkatan jumlah eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* (parasitemia). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya tentang nilai parasitemia dihasilkan dari suatu proses invasi dan partumbuhan atau maturasi parasit dalam sel eritrosit, menyatakan bahwa semakin baik dan cepat suatu proses invasi dan maturasi tersebut maka akan meningkatkan jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*.



Gambar 1. Rata-rata parasitemia (%) dengan pemberian kalsium dan kontrol (ML 10 %) hari ke-1 sampai ke-6.

Tabel 1. Rerata total parasitemia (%) pada media biakan dasar ML 10% dengan pemberian kalsium (15 µM) dan kontrol

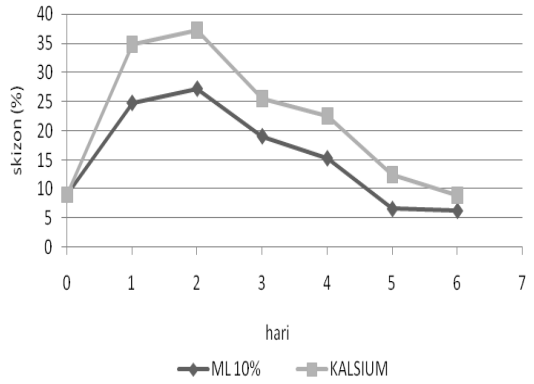
Media Biakan	Parasitemia (Rerata ± SD)	Uji t test ($p < 0.05$)
Kontrol (ML 10%)	8,28 ± 2,82	0,000
Kalsium	11,09 ± 4,01	

Kirk (2001) [5] dan Wasserman (1999) [6], menyatakan bahwa kalsium berperan penting dalam proses invasi merozoit dan proses maturasi dalam sel eritrosit. Selain itu masuknya kalsium ke dalam sel eritosit selama proses invasi parasit akan menyebabkan peningkatan konsentrasi kalsium pada sitoplasma merupakan *second massengger* dalam menstimulasi suatu aktifitas molekuler yang mengakibatkan sel eritrosit semakin mudah terinfeksi parasit.

Skizon

Hasil pengamatan pada hari ke-1 dan hari ke-2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah skizon tertinggi yakni pada media yang mengandung kalsium sebanyak 37,22 ± 2,96, sedangkan pada kontrol (ML 10%) 27,38 ± 6,99. Setelah hari kedua, rerata jumlah skizon yang

dihasilkan oleh semua media biakan mengalami penurunan sampai hari ke-6 (Gambar 2).



Gambar 2. Rerata skizon (%) dengan pemberian kalsium dan media biakan dasar ML 10% (kontrol) hari ke-1 sampai ke-6

Hasil pengamatan skizon dengan pemberian kalsium menunjukkan adanya peningkatan maturasi. Nilai rerata skizon pada media biakan mengandung kalsium (23,52 ± 1,09) dan kontrol ML 10% (16,55 ± 2,00). Secara keseluruhan dapat ditunjukkan adanya perbedaan bermakna pada uji statistik T-*test* (± 0,05) (Tabel 2).

Kalsium berperan penting dalam pertumbuhan normal parasit dalam sel eritrosit. Kalsium ditemukan lebih tinggi pada sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*. Selain itu terjadi peningkatan kalsium pada fase maturasi tropozoit yang akan mengalami perubahan menjadi skizon [7]. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa konsentrasi kalsium pada fase skizon jam ke-36 terlihat adanya perbedaan 3 kali lebih tinggi pada kalsium sitosol dibandingkan dengan kelompok kontrol dan mencapai puncak pada fase skizon jam ke-44, yaitu terlihat perbedaan 4 kali lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini juga didukung oleh penelitian Kirk (2001) [5], yang menyatakan bahwa pada fase awal tropozoit konsentrasi kalsium sitosol parasit mencapai 40-44 nM dan meningkat menjadi 110–125 nM pada fase akhir tropozoit atau fase skizon. Salah satu mekanisme fungsi kalsium yang berhubungan dengan proses maturasi parasit *Plasmodium falciparum* dalam sel eritrosit adalah peran kalsium dalam menstimulasi aktifnya enzim protein kinase dari *Plasmodium falciparum* yaitu PfCDPK1. PfCDPK1 berperan dalam proses biogenesis yaitu proses pembentukan membran vakuola *parasitophorus* pada fase tropozoit, sistem *vacuolar tubular* didalam sitosol eritrosit, vakuola yang bersifat dinamik pada fase tropozoit dan skizon, serta pembentukan membran pada merozoit yang belum matur. Proses tersebut merupakan mekanisme yang menunjang proses maturasi [8].

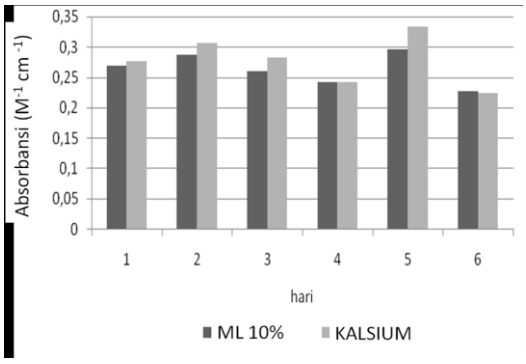
Tabel 2. Rerata total bentuk skizon (%) pada media biakan dasar ML 10% dengan pemberian kalsium (15 μM) dan kontrol

Media Biakan	Skizon (Rerata ±SD)	Uji t'test (p < 0.05)
Kontrol (ML 10%)	16,55 ± 8,80	0,000
Kalsium	23,52 ± 10,83	

Hemolisis

Hasil rerata pengamatan hemolisis pada media biakan menunjukkan bahwa pada hari ke-2 terjadi perbedaan, yaitu pada biakan kontrol (ML10%) sebesar 0,28 ± 0,01 dan pada biakan kalsium sebesar 0,30 ± 0,01 (sampai pada hari ke-4). Sedangkan pada hari ke-5 menunjukkan adanya peningkatan nyata, yaitu pada media biakan kontrol (ML10%) sebesar 0,29 ± 0,01 dan kalsium sebesar 0,33 ± 0,01 (Gambar 3).

Hasil analisis pada hari ke-5 dan ke-6 (Gambar 4) menunjukkan bahwa terdapat sel eritrosit tidak normal. Sel eritrosit ini mengalami *crenation* pada media kontrol (ML 10%). *Crenation* terlihat pada sel eritrosit yang tidak terinfeksi *Plasmodium falciparum* dan tidak terlihat pada sel yang terinfeksi. Hal ini menjelaskan bahwa tingginya nilai absorbansi pada hari ke-5 dapat disebabkan oleh lisisnya sel eritrosit disebabkan karena kondisi eritrosit yang tidak normal akibat lama waktu perlakuan.



Gambar 3. Rerata absorbansi (cm M) dengan pemberian kalsium pada media biakan dasar ML 10% dan kontrol (ML 10%) hari ke-1 sampai ke–6

Hasil analisis statistik dengan T-*test* (α= 0,05) diketahui bahwa secara keseluruhan media biakan kalsium (0,278 ± 0,012) terdapat perbe-

daan yang signifikan terhadap kelompok media biakan kontrol ML 10% (0,265 ± 0,007).

Tabel 3. Rerata total absorbansi (cm M) pada media biakan dasar ML 10% dengan pemberian glukosa kalsium (15 µM) dan kontrol (ML 10%)

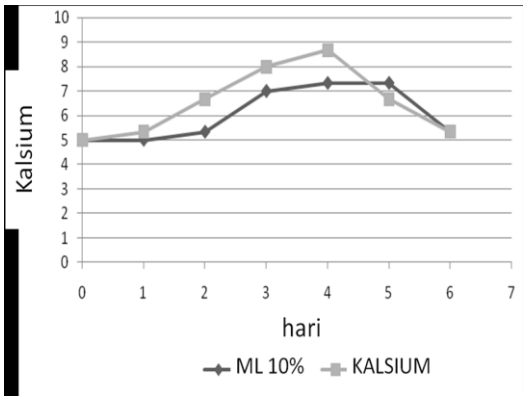
Media Biakan	Absorbansi (Rerata ± SD)	Uji t'test (p < 0.05)
Kontrol (ML 10%)	0,265 ± 0,02	0,000
Kalsium	0,278 ± 0,03	

Hasil penelitian terhadap hemolisis menunjukkan bahwa penambahan kalsium memberikan nilai absorbansi lebih tinggi dibandingkan dengan media biakan kontrol (Tabel 3). Hal ini memberikan suatu gambaran yang sama terhadap peningkatan nilai parasitemia dan bentuk skizon. Menurut Gracia (1999) [9], peningkatan level kalsium sitosol bagi parasit merupakan hal penting untuk terjadinya proses invasi, sinkronisasi dan ekspresi gen yang menyebabkan membran sel eritrosit *ruptur* oleh maturnya skizon. Hal ini didukung oleh Wesserment (1999) [6] yang menjelaskan bahwa pemberian kalsium menyebabkan konsentrasi kalsium intraseluler meningkat sebesar 30% dan enzim transglutaminase pada sel eritrosit terinfeksi *P. falciparum* terlihat lebih dominan pada tahap akhir fase skizon. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa perubahan rigiditas dan perubahan bentuk sel eritrosit pada akhir fase maturasi parasit merupakan suatu mekanisme dikeluarkannya merozoit hasil maturasi dengan lisisnya sel eritrosit. Pada kelompok kontrol eritrosit yang tidak terinfeksi *Plasmodium falciparum* tidak terlihat adanya fenomena diatas.

Konsentrasi Kalsium

Hasil pengamatan terhadap konsentrasi kalsium menunjukkan adanya perbedaan nilai rerata konsentrasi kalsium pada hari ke-3 dan hari ke-4 yaitu terhadap media yang mengandung kalsium (6,66 ± 0,57) dengan media biakan kontrol ML 10% (5,66 ± 1,15). Pada hari ke-4 konsentrasi kalsiun mengalami peningkatan yang signifikan pada semua media yakni media biakan kontrol ML 10% (8,66 ± 0,57) dan kalsium (8,66 ± 1,52) (Gambar 4).

Terjadinya peningkatan kalsium ke dalam sel eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* terjadi pada media biakan dengan kalsium (Gambar 4 dan Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa masuknya kalsium ke dalam eritrosit mengakibatkan adanya pengaruh nilai konsentrasi kalsium yang berbeda pada media biakan dengan kalsium maupun kontrol. Masuknya kalsium ke dalam parasit sangat penting untuk proses invasi normal, terlihat 2 jam setelah invasi parasit kedalam eritrosit terjadi peningkatan konsentrasi kalsium 10 kali dari sel eritrosit normal [10].



Gambar 4. Rerata sel eritrosit yang terdapat bercak kalsium dari 200 sel eritrosit yang diamati, dengan pemberian kalsium dan media biakan dasar ML 10% (kontrol) hari ke-1 sampai ke-6.

KESIMPULAN

Pemberian kalsium dapat meningkatkan pertumbuhan *P. falciparum*. Peningkatan pertumbuhan *P. falciparum* yang signifikan dapat dilihat dari peningkatan jumlah sel eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum*, maturasi parasit *P. falciparum*, peningkatan hemolisis dan peningkatan konsentrasi kalsium dalam sel eritrosit pasca pemberian kalsium.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harijanto, P.N. 2000. Malaria: Epidemologi, Patogenesis, Manifasi Klinis dan Penanganannya**,** Edisi pertama. Penerbit EGC. Jakarta.
2. Desai, S.A., E.W. McCleskey. 1996. A Novel Pathway for Ca^{2+} Entry into *Plasmodium falciparum*–Infected Blood Cell. *Am J Trop Med Hyg*. 54. 5:464-470.
3. Tiffert, T., H.M. Staines. 2000. Functional State The Plasma Membrane Ca2+ Pump in *Plasmodium falciparum* Infected Human Red Blood Cells. *J Physiol.* 525. 1:125-134.
4. Krogstad, D.J. 1991. Physiologic Rate of Carrier-Mediated Ca2+ Entry Matches Active Extrusion in Human Erythrocytes. *The journal of general physiology*. 98:349-364.

5. Kirk, K. 2001. Membrane Transport in The Malaria-Infected Erythrocyte. *Physiological Reviews*. Vol.81. 2:495-537.
6. Wasserman, M., A.M. Marquez, M. Urquiza, P. Jimenez. 1999. Increase of a Calcium Independent Transglutaminase Activity in The Erythrocyte during The Infection with *Plasmodium falciparu. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94. 1:95–100.
7. Kramer, R., H. Ginsburg. 1991. Calcium Transport and Compartement Analysis of Free and Exchangeable Calcium in *Plasmodium falciparum* Infected Red Blood Cells. *J. Protozool*. 38. 6:594–601.
8. Kappes, B. 2001. Calcium-Dependent Protein Kinase of *Plasmodium falciparum*: Protein kinase as Drug Target for Parasitic Protozoa. COST. Paris.
9. Garcia, C.R.S., 1999. Calcium Homeostasis and Signaling in the Blood–Stage Malaria Parasite. *Parasitology Today*. 15. 12:488–491.
   Wasserman, M., Vernot, J.P. 1990. Role of Calcium and Erythrocyte Cytoskeleton Phosphorylation in the Invation of *Plasmodium falciparum. Parasitol Res.* 76. 8:681-688.