

## LAPORAN KASUS

## EFFECT OF COMBINED THERAPY USING CHLOROQUINE AND VITAMIN C TO THE PERITONEAL MACROPHAGE FUNCTION IN BALB/C STRAIN MICE INFECTED BY *Plasmodium berghei*

Loeki Enggar Fitri\*, Wongso Suhendro\*\*, Sri Murwani\*\*, I Ketut Gede Muliarta\*\*, Mulyohadi Ali\*\*\*

\*Laboratorium Parasitologi, \*\*Laboratorium Sentral Biomedik, \*\*\*Laboratorium Farmakologi.

### ABSTRACT

*In acute infection, malaria will induce cellular immunity by activating T lymphocytes and macrophages cells. This induction indirectly triggers free radicals production in order to eliminate the parasites from red blood cells, however high concentration of these molecules can cause vital tissue pathological changes on host. In late phase of malarial infection, there are immunosuppression on macrophages activity including antigen presenting and secretion of immunoregulated mediator. It has been anticipated, vitamin C as antioxidant would diminish the side effect of these free radicals during malarial infection and increase the immunity. To see the effect of combination chloroquin and vitamin C in hastening the recuperative process by decreasing parasitemia and increasing the phagocytosis function of macrophages during Plasmodium berghei infection. This study has been carried out using 3 groups of BALB/c mice, all group were inoculated with  $1 \times 10^7$  Plasmodium berghei infected red-blood cells. No drug was given on control group (IK). In experimental group we introduced an oral therapy of chloroquin for 5 days in 1.4 mg/cc dosage and vitamin C for 7 days in 0.2 mg/cc dosages concurrently with a Plasmodium berghei inoculation (IKC). One group was only given chloroquin at the same dosage and no drug was given at the control group (IK). A Giemsa stain and a phagocytosis macrophage peritoneal test was conducted to observed the degree of parasitemia and the capacity of macrophage cells that phagocyte latex particles. Data was recorded serially on day-0, day-3, and day-7. The result indicated that a combining therapy using vitamin C and Chloroquin is more effective in reducing parasites population than a single drug using chloroquin alone. On day-7, Anova test indicated a significant difference between the three group in phagocytosis macrophage peritoneal activity. Vitamin C has an immunostimulator effect by raising phagocytosis macrophage activity and may be an antioxidant effect by repairing the tissue damage.*

**Key word:** *Plasmodium berghei, Vitamin C, Phagocytosis, Peritoneal macrophage.*

### ABSTRAK

*Aktivasi sel limfosit T dan sel makrofag terjadi pada infeksi malaria akut. Aktivasi ke dua sel tersebut secara tidak langsung akan merangsang produksi radikal bebas yang ditujukan untuk eliminasi parasit di dalam sel darah merah, akan tetapi konsentrasi yang tinggi dari molekul ini dapat menyebabkan perubahan patologis pada organ vital dari inang. Sebaliknya, infeksi malaria yang kronis akan menyebabkan immunosupresi pada aktivasi makrofag dalam hal kemampuan mempresentasikan antigen dan sekresi mediator keseimbangan. Pemberian vitamin C sebagai antioksidan diduga akan menurunkan efek samping dari radikal bebas dan meningkatkan imunitas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah pemberian kombinasi klorokuin dan vitamin C akan mempercepat proses penyembuhan dengan jalan menurunkan derajat parasitemia dan meningkatkan fungsi fagositosis makrofag selama infeksi Plasmodium berghei. Telah dilakukan suatu penelitian eksperimental dengan menggunakan 3 kelompok mencit galur Balb/C yang diinfeksi dengan  $1 \times 10^7$  sel darah merah yang mengandung Plasmodium berghei. Kelompok kontrol negatif tidak diberikan pengobatan apapun (I), kelompok kontrol positif hanya diberikan terapi klorokuin selama 5 hari dengan dosis 1,4 mg/cc (IK), sedang pada kelompok perlakuan diberikan terapi klorokuin selama 5 hari dengan dosis 1,4 mg/cc dan vitamin C selama 7 hari dengan dosis 0,2 mg/cc (IKC). Dilakukan pemulasan Giemsa untuk monitor derajat parasitemia dan test untuk kemampuan fagositosis makrofag peritoneal menggunakan latex beads. Data dilakukan serial pada hari ke 0, 3 dan 7. Hasil mengindikasikan bahwa terapi kombinasi menggunakan klorokuin dan vitamin C lebih efektif dalam menurunkan derajat parasitemia daripada pemberian terapi tunggal klorokuin. Dengan test Anova, pada hari ke 7 didapatkan perbedaan yang bermakna antara ketiga kelompok dalam hal kemampuan fagositosis makrofag peritoneal ( $p < 0,05$ ). Vitamin C dapat menstimulasi imunitas seluler dengan jalan meningkatkan fungsi fagositosis makrofag dan sebagai antioksidan kemungkinan besar juga memperbaiki kerusakan sel yang terjadi selama infeksi malaria.*

**Kata kunci :** *Plasmodium berghei, Vitamin C, fagositosis, Makrofag peritoneal.*

### PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh protozoa intraseluler yang bergenus Plasmodium. Keberadaan parasit ini di dalam tubuh akan merangsang system imun dengan jalan

mengaktivasi sel limfosit T dan makrofag disertai produksi mediator *Tumour necrosis factor Alfa* (TNF-  $\alpha$ ) (1).

Respon imun dalam rangka melawan keberadaan parasit yang melibatkan makrofag, limfosit T dan berbagai sel lain akan disertai metabolisme aktif dan pembentukan *reactive oxygen*

*species* (ROS) yang bersifat oksidatif. Radikal bebas ini mampu menyebabkan kerusakan jaringan tubuh (2). Radikal bebas juga dibentuk oleh sel sel fagosit untuk melawan Plasmodium di dalam sel darah merah sehingga membantu dalam mengeliminasi parasit, namun di lain pihak radikal bebas yang terbentuk ini juga mampu menghancurkan / melisis sel darah merah normal serta merusak sel endotel pada pembuluh darah berbagai organ. Dengan demikian kerusakan oksidatif oleh radikal bebas menjadi salah satu penyebab terjadinya kelainan patologis pada penderita malaria (3).

Dengan diketahuinya peranan radikal bebas pada penyakit malaria, maka perlu adanya pemikiran penggunaan terapi antioksidan sebagai terapi suportif yang dapat mendukung dalam proses penyembuhan penderita malaria dan mengurangi berbagai resiko yang potensial terjadi pada penderita. Pada penelitian terdahulu, Shankar *et al* (1999) menggunakan antioksidan vitamin A untuk diujikan pada 480 orang anak yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*. Hasil menunjukkan bahwa perhitungan derajat parasitemia kelompok yang diberi suplemen vitamin A 68% lebih rendah daripada kelompok anak yang diberi plasebo saja (4).

Asam askorbat merupakan *scavenger* yang kuat dan mampu melindungi sel tubuh dari efek radikal bebas, di antaranya dengan melindungi plasma lipid dari peroksidasi serta melindungi membran dan lipoprotein dari peroksidasi lipid. Asam askorbat yang larut air banyak didapatkan dalam cairan ekstraseluler akan tetapi beberapa penelitian menunjukkan bahwa keberadaan asam askorbat bisa ditemukan di dalam sel. Asam askorbat masuk ke dalam sel dengan menggunakan mekanisme transport aktif melawan gradient konsentrasi dengan melibatkan ion  $Na^+$  (5). Asam askorbat memiliki sifat antioksidan yang multiple yaitu memungut superoksid, oksigen tunggal dan radikal hidroksil. Pada kasus malaria asam askorbat mampu menghambat peroksidasi lipid yang diinduksi campuran hidrogen peroksida dan hemoglobin yang banyak dilepas dalam plasma. Keberadaan radikal bebas akan dinetralkan oleh vitamin C sebagai *scavenger* sehingga menjadi tidak berbahaya lagi bagi tubuh. Dengan demikian maka akan dapat membantu mempercepat proses penyembuhan penyakit malaria.

Diketahui bahwa keberadaan parasit yang menetap pada tubuh manusia dapat menimbulkan reaksi immunosupresi dan dapat menyebabkan trauma jaringan yang patologis (5). Sehingga masalah utama yang terjadi pada patologi malaria adalah meningkatnya produksi radikal bebas dan menurunnya respon imun (immunosupresi) pada tahap akhir perjalanan penyakit (6). Immunosupresi yang terjadi pada malaria ternyata mengenai respon imun seluler maupun humoral. Efek immunosupresi ini terjadi pada aktivitas makrofag, presentasi antigen dan sekresi mediator-mediator imunoregulator (7).

Pemberian vitamin C disini juga dapat ditujukan sebagai immunostimulator karena vitamin C adalah nutrisi yang mampu meregulasi system imun karena kemampuan anti viral dan antioksidannya, mempunyai peran penting dalam fungsi fagositik dan mempunyai efek stimulasi sel limfosit (8).

Klorokuin bekerja sebagai anti malaria dengan cara menghambat sintesa asam nukleat dan protein pada sel protozoa. Selain sebagai anti malaria klorokuin juga memperlihatkan efek anti inflamasi dengan jalan mempengaruhi fungsi enzim lisosomal, menghambat biosintesa asam nukleat, menghambat

kemotaksis sel lekosit PMN dan fagositosis, mempengaruhi fungsi makrofag dan limfosit serta mempengaruhi pembentukan kompleks imun. (9). Disamping itu klorokuin ternyata mempunyai efek kumulatif pada berbagai organ sehingga menyebabkan kerusakan jaringan terutama dalam dosis yang tinggi dan jangka lama (10).

Dalam penelitian ini, pemberian klorokuin dikombinasikan dengan asam askorbat (vitamin C) dengan maksud sebagai berikut: klorokuin akan bekerja membunuh parasit sedangkan asam askorbat akan bekerja menstimulasi aktifitas sel-sel imun seperti sel fagosit yang mengalami depresi akibat infeksi malaria dan pemberian obat klorokuin, disamping bekerja sebagai antioksidan yang mengikat radikal bebas (11).

Tujuan dari penelitian ini adalah 1) untuk mengetahui kemampuan vitamin C dalam meningkatkan kecepatan eliminasi parasit pada mencit galur Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan klorokuin, 2) mengetahui kemampuan vitamin C dalam peningkatan fungsi fagositosis makrofag peritoneal mencit galur Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan klorokuin,

## METODOLOGI

### a. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian empirik eksperimental yang dilaksanakan mulai Februari 2001 sampai maret 2001 di laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Subyek penelitian adalah mencit galur Balb/c umur 6-8 minggu dengan berat badan 20-25 gram yang dipilih secara acak.

Ada 3 kelompok mencit yaitu kelompok kontrol positif (I), kelompok perlakuan 1 (IK), dan kelompok perlakuan 2 (IKC). masing-masing kelompok terdiri atas 10 ekor mencit. Kelompok kontrol positif adalah kelompok mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* sebesar  $1 \times 10^7$  tetapi tanpa diberi klorokuin dan vitamin C. Kelompok perlakuan 1 (IK) adalah kelompok mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* sebesar  $1 \times 10^7$  dan diberi klorokuin saja sebesar 1,4 mg/cc setiap hari selama 3 hari. Kelompok perlakuan 2 (IKC) adalah kelompok mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dengan dosis sama dan diberi kombinasi klorokuin dengan dosis dan waktu pemberian yang sama dan vitamin C sebesar 0,2 mg/gram setiap hari selama 7 hari. Dari setiap kelompok pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7 diambil secara acak masing-masing 3 ekor mencit untuk dibunuh dan diisolasi makrofag peritonealnya.

### b. Isolasi dan kultur makrofag peritoneal

Isolasi dan kultur makrofag dilakukan menurut cara Fitri, 1997 (12), sedang uji kemampuan fagositosis dilakukan secara *in vitro* menurut Supargiyono, 1993 (13) dengan menggunakan latex beads (*Sigma chemical Co*), secara ringkas sebagai berikut: mencit yang telah dibunuh diletakkan dalam posisi terlentang, kulit dibersihkan dengan alkohol 70% terutama bagian perut, secara hati-hati kulit bagian perut dan selubung peritoneum dibuka dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Sebanyak 10 ml medium tumbuh (RPMI + serum) diinjeksikan ke dalam rongga peritoneum dan digoyang selama 3 menit. Medium tumbuh kemudian diaspirasi kembali dan disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 8 menit. Pelet yang didapat diresuspensikan dengan medium tumbuh sehingga terdapat  $2 \times 10^5$  sel/ml dan dimasukkan dalam mikroplate 24 sumuran. Sel kemudian dikultur dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37°C selama 2 jam, sel

makrofag akan melekat sedang sel-sel yang tidak melekat dibuang. Sel makrofag dicuci dengan RPMI tanpa serum sebanyak 2 kali dan terakhir dikultur dengan medium tumbuh selama 24 jam.

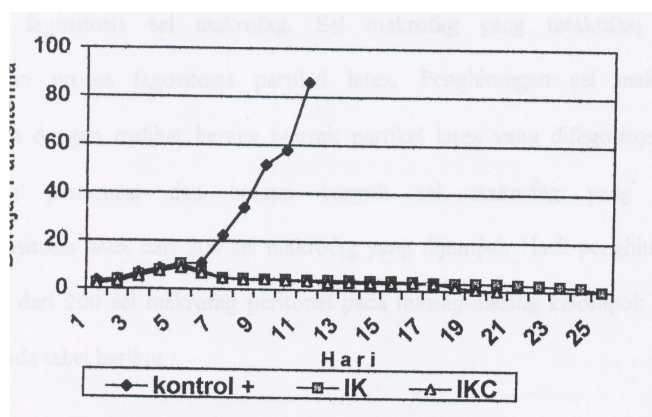
### c. Uji fungsi fagositosis makrofag peritoneal

Setelah dicuci dengan PBS, latex beads diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi 10<sup>6</sup>/ml. Sel makrofag yang telah dikultur 20-24 jam dicuci dengan RPMI. 500 ul latex yang mengandung kepadatan sel latex 10-20 kali kepadatan sel makrofag diberikan pada sumuran yang berisi sel makrofag. Inkubasi ke dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> dan 37°C selama 1 jam. Kemudian supernatan dibuang dan dicuci dengan PBS 3 kali dan dikeringkan, setelah itu difiksasi dengan methanol absolut 30 detik dan dikeringkan, terakhir pulas dengan Giemsa 30%. Pengukuran kuantitatif dapat dilakukan dengan menghitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex dalam 200 sel makrofag kemudian ditentukan jumlah partikel latex yang difagosit oleh tiap sel makrofag.

## HASIL PENELITIAN

### a. Derajat parasitemia

Pemeriksaan rerata derajat parasitemia yang dilakukan pada ketiga kelompok penelitian dapat dilihat pada grafik dibawah ini:

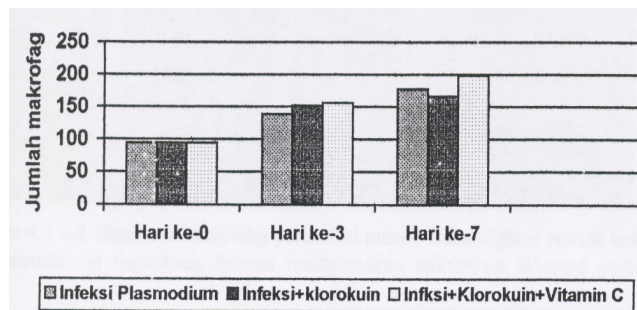


Grafik 1. Derajat parasitemia

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa derajat parasitemia pada kelompok kontrol (I) yaitu kelompok mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa pengobatan mencapai puncaknya pada hari ke 11 dengan parasitemia mencapai 86%, dan segera setelah itu semua mencit mengalami kematian. Untuk kelompok perlakuan 1 (IK) yaitu infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan klorokuin saja parasit tidak ditemukan lagi pada darah tepi pada hari ke 25 (parasitemia 0%). Sedangkan kelompok perlakuan 2 (IKC) yaitu yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan klorokuin dan vitamin C, eliminasi parasit dari darah tepi terjadi pada hari ke 20 pasca infeksi.

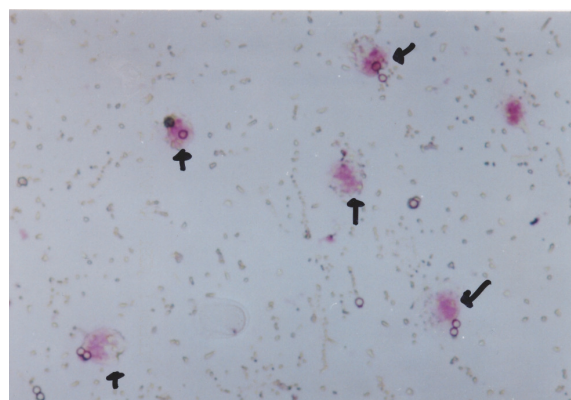
### b. Fungsi fagositosis makrofag peritoneum

Hasil perhitungan rata-rata dari 200 sel makrofag peritoneal pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada grafik 2.

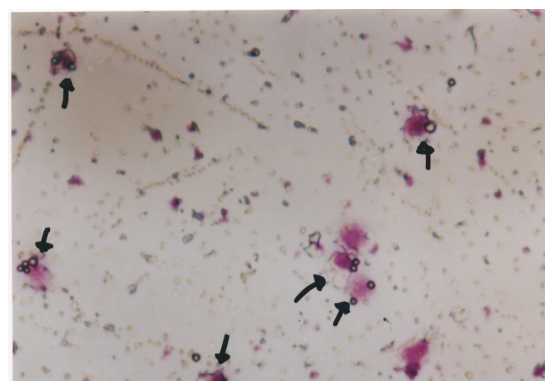


Grafik 2. Rerata jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7.

Dari grafik 2 dapat dilihat bahwa rerata jumlah makrofag yang memfagosit partikel latex pada hari ke-0 adalah 93,7 makrofag untuk semua kelompok. Sedang pada hari ke-3 kelompok kontrol (I) sebanyak 138,33 makrofag, kelompok IK sebanyak 151,7 makrofag dan kelompok IKC 156 makrofag. Pada hari ke-7, rerata jumlah jumlah makrofag yang memfagositosis latex sebanyak 177 makrofag untuk kelompok I, 166 makrofag untuk kelompok IK dan 198,33 makrofag untuk kelompok IKC.

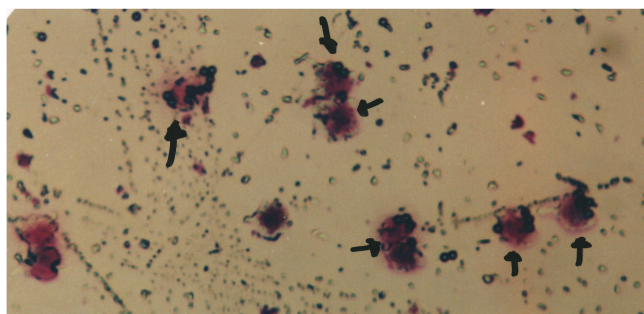


(A)

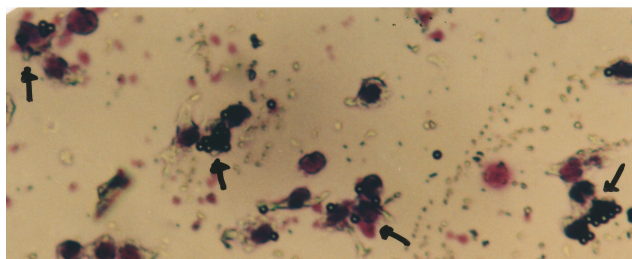


(B)

Gambar 1. Gambaran Makrofag Peritoneal mencit Balb/C betina setelah kultur 24 jam dan uji fagositosis dengan partikel latex pada hari ke 3 setelah infeksi oleh *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan klorokuin saja (A) dan diterapi dengan kombinasi klorokuin dan vitamin C (B) (Pembesaran 200 X)



(A)



(B)

**Gambar 2. Gambaran Makrofag Peritoneal mencit Balb/C betina setelah kultur 24 jam dan uji fagositosis dengan partikel latex pada hari ke 7 setelah infeksi oleh *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan klorokuin saja (A) dan diterapi dengan kombinasi klorokuin dan vitamin C (B) (Pembesaran 200 X)**

Dari perhitungan menggunakan ANOVA satu jalan (*one way ANOVA*) diperoleh hasil sebagai berikut: pada hari ke 3 perlakuan diperoleh hasil yang tidak bermakna ( $p = 0.118$ ), hal ini menunjukkan bahwa pada tahap awal tidak ada perbedaan yang bermakna antar tiga kelompok mencit yang digunakan dalam penelitian ini dalam hal fungsi fagositosis makrofag peritoneal mencit. Sedangkan pada hari ke 7 perlakuan diperoleh hasil yang bermakna ( $p < 0,001$ ), hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke 7 terdapat perbedaan yang bermakna pada fungsi fagositosis makrofag peritoneal mencit antara ketiga kelompok di atas.

Dari hasil perhitungan menggunakan *Tukey's HSD* didapatkan perbedaan yang bermakna untuk perhitungan fungsi fagositosis makrofag peritoneal mencit antara kelompok I dengan IK, kelompok I dengan IKC dan kelompok IK dengan IKC.

## PEMBAHASAN

Pada hasil penelitian ternyata baik terapi dengan menggunakan klorokuin saja maupun kombinasi klorokuin dan vitamin C mampu menurunkan derajat parasitemia dan memberikan kesembuhan pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Meskipun demikian ternyata kombinasi klorokuin dan vitamin C mampu menurunkan derajat parasitemia lebih cepat dibandingkan dengan pemberian klorokuin saja. Hal ini kemungkinan karena pada vitamin C terdapat efek imunostimulator sehingga mampu meningkatkan proliferasi dan aktifitas makrofag peritoneal yang selanjutnya akan menyebabkan

proses pengeliminasian parasit terjadi lebih cepat. Selain itu kemungkinan ke dua, pada kelompok yang diterapi dengan klorokuin saja efek pelepasan radikal bebas masih terjadi sehingga proses penyembuhan dari infeksi malaria berlangsung lebih lambat dibandingkan kelompok yang diterapi kombinasi Klorokuin dan vitamin C, sehingga selain terjadi eliminasi parasit oleh klorokuin maka vitamin C yang bersifat antioksidan akan membantu mencegah kerusakan jaringan akibat radikal bebas.

Pemberian vitamin C ternyata menyebabkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit secara signifikan. Hal ini kemungkinan karena efek imunostimulator yang terdapat pada vitamin C, hal ini telah juga dibuktikan oleh Fuente et al., 1997 yang mendapatkan bahwa vitamin C dapat meningkatkan proliferasi dan aktifitas sel-sel imunokompeten terutama makrofag dan limfosit T. (8)

Dari hasil ini dapat diketahui bahwa radikal oksigen bukan merupakan komponen utama dalam melawan parasit karena jika merupakan komponen esensial maka pemberian antioksidan selama infeksi justru akan mengganggu mekanisme pertahanan tubuh dan hal ini tidak terjadi, bahkan dari penelitian terdahulu terbukti antioksidan akan melindungi eritrosit dari radikal oksigen baik secara *invitro* maupun *in-vivo*. Pada malaria serebral pemberian antioksidan akan melindungi hospes dari kematian. Hal ini membuktikan adanya peran oksigen radikal pada patogenesis malaria serebral. Disebutkan pula bahwa asam askorbat lebih efektif melindungi membran lipid dari kerusakan peroksidatif daripada antioksidan endogen lainnya. Askorbat mampu menghambat peroksidasi lemak yang dihasilkan karena reaksi antara hemoglobin dan hidrogen peroksida selama progresi infeksi.

Dari hasil penelitian diketahui juga bahwa peningkatan persentase derajat parasitemia terutama hari ke 7 sesuai dengan peningkatan jumlah makrofag yang mengalami fagositosis terhadap latex. Hal ini terjadi karena peningkatan derajat parasitemia menyebabkan tubuh meningkatkan system retikuloendotelial (RES) yang mengakibatkan sel-sel imunokompeten juga teraktivasi sehingga terjadi peningkatan respon imun seluler berupa peningkatan aktivitas fagositosis yang berguna untuk eliminasi parasit.

Hasil penelitian untuk kelompok perlakuan 1 (IK) didapatkan pada hari ke-3 setelah infeksi jumlah makrofag yang memfagositosis latex sebanyak 151,7 makrofag dengan persentase derajat parasitemia sebesar 5,1%. Sedangkan pada hari ke-7 dengan perlakuan yang sama diperoleh jumlah makrofag yang memfagositosis latex sebanyak 166 dengan persentase derajat parasitemia 4,5%. Hal ini mungkin karena masih ada antigen sirkulasi yang dilepaskan oleh *Plasmodium* yang secara terus menerus merangsang aktifitas fagositosis sehingga kemampuan fagositosis meningkat walaupun derajat parasitemia telah turun.

Hal yang sama terjadi pada kelompok perlakuan 2 (IKC) yaitu terjadi peningkatan fagositosis yang sangat nyata ketika parasitemia turun, hal ini selain karena adanya antigen di sirkulasi juga disebabkan adanya vitamin C yang bertindak sebagai pro-oksidan yang dapat menarik seluruh sel makrofag di sirkulasi ke dalam cairan peritoneal dan mengaktifkannya (14).

Efektifitas asam askorbat dalam menekan derajat parasitemia dipengaruhi oleh factor imunitas dan factor

antioksidan. Asam askorbat meningkatkan respon imun seluler dan humoral dengan menstimulasi aktivitas antibodi dan sel-sel imun seperti sel fagosit dan netrofil (11). Penelitian sebelumnya menunjukkan kadar asam askorbat endogen menurun secara signifikan selama infeksi *Plasmodium*, sedang kadar vitamin lain seperti beta karoten penurunannya tidak signifikan (15). Dalam hal ini pemberian asam askorbat eksogen akan bermanfaat bagi penderita malaria, terutama pada saat kadar enzim antioksidan rendah.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

- a. Pemberian terapi kombinasi klorokuin dan vitamin C dapat meningkatkan kecepatan eliminasi parasit dan menekan derajat parasitemia. Hal ini mungkin karena efek vitamin C sebagai imunostimulator dan antioksidan.
- b. Pemberian terapi kombinasi klorokuin dan vitamin C dapat meningkatkan respon imun seluler dengan jalan meningkatkan fungsi fagositosis makrofag peritoneal.

### I.

### DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Abbas, K.A., Lichtman, A.H., and Prober, Cellular & Molecular Immunology 4<sup>rd</sup> edition. Philadelphia, WB Saunders Company. 2000: 284.
2. Symons, Martin, C.R., Free Radicals in Biologicals Systems, Trace Element, Micro Nutrients and Free Radicals, Human Press Inc, USA. 1991.
3. Hunt, N.H., Kopp, M., Stocker, R., Free Radicals and Antioxidants in Malaria in Lipid -Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Application, A.S.H. Ong&L. Packer (ends). 1992: 337-53.
4. Shankar, Anuraj, Effect of Vitamin A Supplementation on Morbidity due to Plasmodium Falciparum in Young Children in Papua New Guinea: a Randomised trial. USA. 1999: 203-209.
5. Halliwell & Gutteridge, Free radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> edition Oxford University Press. New York. 1998.
6. Vineis, P., Haematopoietic Cancer and Medical History: A Multi Center Case Control Study, Journal of Epidemiology and Community Health. 2000.
7. Wyler, David, J., Modern Parasitic Biology: Cellular, Immunological and Molecular aspects, WHFreeman and Company, New York. 1990.
8. Fuente, Md, Immune Function in Aged Women is Improved by Ingestion of Vitamins C and E. Can.J.Physiol.Pharmacol.1997: 76.
9. Melmon, K.L., Clinical Pharmacology, Basic Principles in Therapeutics, Third edition, McGraw-Hill, New York. 1992.
10. Ganiswara, S.G., Farmakologi dan Terapi, Edisi 4, Penerbit FKUI Jakarta. 1995.
11. Null & Gary, The Antioxidant Vitamin, Vitamin C, Townsend Letter For Doctors, February/March 1994. [Http://www.smartrac/garynull/](http://www.smartrac/garynull/)
12. Fitri, L.E., Kaitan antara Kadar Interferon Gamma dan Tumor Necrosis Factor dengan Imunitas Terhadap Infeksi Malaria. Tesis, PPS, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 1997.
13. Supargiyono, Production, Proliferation and Functional Activities of Mononuclear Phagocytes During Plasmodium Vinkei Petteria Infection in Mice. Thesis Submitted for The Degree of Doctor of Philosophy in the faculty of Science of The University of London. King's College London. 1993.
14. Subandi, Efek Antioksidant (VitaminC) Terhadap Jumlah dan Fungsi Macrophages Alveoli serta kadar SOD Jaringan Paru Tikus yang dipapar degan Asap Rokok Kronis. Tesis PPS Universitas Brawijaya. 1998.
15. Njoku, O.U., Ononogbu, I.C., Nwachukwu, D.E., Plasma Cholesterol, B-carotene and ascorbic acid changes in Human Malaria. In J Community Diseases (On line) Sep.1998: 27(3): 186-90 ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/PubMed))

### Saran

Penelitian ini membutuhkan penelitian lanjutan karena:

- a. Penelitian ini hanya melihat efek terapi kombinasi klorokuin dan vitamin C pada beberapa variable saja yaitu derajat parasitemia dan fungsi fagositosis, sehingga diperlukan penelitian lanjutan dengan variable lain seperti imunitas humoral, aktifitas radikal bebas dan lain-lain.
- b. Pemberian vitamin C dilakukan bersamaan dengan pemberian infeksi *Plasmodium berghei* sehingga tidak jelas apakah vitamin C ini memberikan perlindungan kuratif atau preventif. Sehingga perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sample yang lebih besar dan pemberian vitamin C dalam waktu yang berbeda
- c. Dosis vitamin C yang digunakan adalah tunggal sehingga tidak bisa menunjukkan mekanisme kerjanya apakah bersifat aditif atau inisiasi.