

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Malaria adalah salah satu penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh *Plasmodium sp. P. vivax* dan *P. falciparum* merupakan spesies *plasmodium* yang sering menjadi penyebab infeksi pada manusia.^{1,2,3} Malaria telah menjadi masalah kesehatan secara global. Data WHO pada Malaria Report 2017 menunjukkan bahwa sekitar 216 juta kasus malaria terjadi di seluruh dunia pada tahun 2016 dan angka kematian malaria mencapai 445.000 di seluruh dunia.^{4,3} WHO juga melaporkan pada tahun 2016 angka kejadian malaria di Indonesia mencapai sekitar 16,7 juta dengan jumlah angka kematian akibat malaria mencapai sekitar 161 jiwa.⁵ Kawasan benua afrika (80%) diikuti asia (6%) menunjukkan kematian tertinggi akibat malaria berat. *P. falciparum* merupakan parasit penyebab malaria berat hampir diseluruh dunia.^{2,5} Komplikasi malaria berat sering menyebabkan kematian antara lain malaria serebral, anemia berat, cedera ginjal akut, udem paru, *jaundice* berat serta asidosis metabolik.⁶

Patogenesis malaria berat telah diteliti secara luas dan pengetahuan mengenai hal tersebut juga belum dimengerti secara lengkap. Faktor imunologi diduga memiliki peran cukup dominan.⁶ Respon imun alamiah maupun didapat erat kaitannya dengan limpa yang merupakan organ limfoid sekunder.⁷ Peran penting limpa pada malaria antara lain

mengelminasi eritrosit berparasit dari sirkulasi, sebagai tempat utama *eritropoiesis* dan *hematopoiesis* serta tempat dihasilkannya sel T dan sel B yang aktif.^{8,9} Pengaturan sistem kekebalan tubuh melibatkan mekanisme apoptosis atau *programmed cell death* (PCD) sel limpa. Mekanisme apoptosis juga berperan dalam mengatur siklus hidup sel itu sendiri atau *homeostasis*.^{10,11,12,13} Apoptosis di awal infeksi akan menyebabkan infiltrasi parasit yang kuat tentu ini merugikan sedangkan bila terjadinya apoptosis di fase penyembuhan infeksi akan bermanfaat dalam membatasi respon imun. Penelitian yang dilakukan pada mencit model malaria didapatkan hiperplasia pulpa putih disertai penurunan area *periarteriolar lymphoid sheath* (PALS) tetapi terdapat peningkatan folikel sel B dan *germinal center*. PALS merupakan area sel T, apabila terjadi apoptosis didaerah ini maka pengenalan antigen oleh DCs akan terhambat yang pada akhirnya diferensiasi dan proliferasi sel T tidak berjalan dengan baik.⁸ Peran penting sel limpa dalam mengatur respon imun pada infeksi malaria diharapkan mampu mengurangi resiko terjadinya komplikasi kematian.

Kematian sel limpa yang disebabkan oleh proses apoptosis melibatkan suatu protein yang penting dalam menjaga homeostasis dalam mengatur kematian sel dan inflamasi. Caspase 3 dan caspase 8 merupakan protein petanda penting dalam proses apoptosis jalur ekstrinsik.¹⁵ Penelitian mengenai peran caspase ini dalam proses apoptosis sel limpa memperlihatkan adanya peningkatan ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada infeksi *Plasmodium*.¹³

Penelitian mengenai patogenesis malaria berat pada manusia sangat terbatas, sehingga penggunaan hewan coba sebagai pengganti sangat bermanfaat. Infeksi *P. berghei* ANKA (PbA) pada mencit menyebabkan malaria berat hampir sama dengan infeksi *P.falciparum* pada manusia.⁷ Pemilihan PbA dikarenakan memiliki kesamaan dalam menimbulkan kondisi malaria berat pada manusia, seperti malaria serebral,^{16,17} injuri pada paru, injuri pada hepar, injuri pada ginjal.¹⁹ Infeksi PbA pada malaria serebral memiliki variasi genetik tiap masing masing strain mencit yang akan berhubungan dengan produksi sitokin.¹⁷ Mencit swiss merupakan hewan coba serebral malaria memiliki karakteristik neuropatologis bila diinfeksi dengan parasit *Plasmodium* yang mirip dengan malaria serebral pada manusia.^{19,7}

Sejumlah tanaman obat telah diteliti sebagai terapi pendamping obat anti malaria standar. Daun sirsak (*Anona muricata*) memiliki kandungan *acetogenin* yang telah terbukti memiliki efek imunomodulator pada eksperimental malaria serebral (EMS).^{20,21} Efek imunomodulator ekstraksi etanol daun *Anona muricata* (EDAM) telah diteliti pada model mencit dengan infeksi berat PbA. Salah satu penelitian tersebut EDAM mampu meningkatkan produksi IL-10 oleh sel limpa mencit swiss dengan infeksi berat PbA.²² Peningkatan produksi IL-10 tersebut ternyata masih dibawah produksi mencit sehat. Pengamatan mikroskopis didapatkan bahwa EDAM meningkatkan secara bermakna diameter pulpa putih mencit dengan infeksi berat PbA, walaupun demikian EDAM tidak mempunyai pengaruh bermakna terhadap produksi sitokin anti-apoptosis (IL-7 dan IL-15) oleh sel limpa

mencit swiss dengan infeksi berat PbA.⁵² Hasil dari beberapa penelitian tersebut masih perlu diperjelas mengenai peran EDAM dalam menurunkan aktivitas apoptosis sel limpa melalui ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada infeksi malaria berat.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah “Bagaimana efektivitas pemberian EDAM dalam menurunkan aktivitas apoptosis sel limpa pada malaria berat dinilai dari caspase 8 dan caspase 3 pada mencit *Swiss* dengan Infeksi Berat *Plasmodium berghei* ANKA?”

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 TUJUAN UMUM

Membuktikan pemberian EDAM dapat menurunkan aktivitas apoptosis sel limpa pada malaria berat dinilai dari caspase 8 dan caspase 3 pada mencit *Swiss* dengan Infeksi berat *Plasmodium berghei* ANKA.

1.3.2 TUJUAN KHUSUS

1.3.2.1 Membuktikan ada perbedaan ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada sel limpa antara kelompok perlakuan diberi dosis EDAM 100mg/kgBB/hari dan 150mg/kgBB/hari pada mencit swiss dengan infeksi berat *Plasmodium berghei* ANKA dibanding kontrol sakit.

1.3.2.2 Membuktikan ada perbedaan ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada sel limpa antara kelompok yang diberi dosis EDAM 100mg/kgBB/hari dan 150mg/kgBB/hari pada mencit swiss dengan infeksi berat *Plasmodium berghei* ANKA dibanding kontrol sehat.

1.3.2.3 Membuktikan ada perbedaan ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada sel limpa antara kelompok yang diberi dosis EDAM 100mg/kgBB/hari dan 150mg/kgBB/hari pada mencit swiss dengan infeksi berat *Plasmodium berghei* ANKA dibanding kelompok yang diberi EDAM tanpa infeksi berat *Plasmodium berghei* ANKA.

1.3.2.4 Membuktikan ada perbedaan ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada sel limpa diantara kelompok perlakuan yang diberi dosis EDAM 100mg/kgBB/hari dan 150mg/kgBB/hari pada mencit swiss dengan infeksi berat *Plasmodium berghei* ANKA.

1.3.2.5 Membuktikan adanya hubungan antara ekspresi caspase 8 dan caspase 3 sel limpa pada malaria berat mencit *Swiss* dengan Infeksi Berat *Plasmodium berghei* ANKA

1.4 MANFAAT PENELITIAN

1.4.1 Manfaat bagi pendidikan keilmuan

Memberikan informasi manfaat daun sirsak dapat memberikan efek protektif bagi individu sehat yang kemudian terinfeksi *plasmodium*

dari komplikasi malaria berat. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lain dalam pengembangan fitofarmaka.

1.4.2 Manfaat bagi masyarakat

Memberikan informasi kepada masyarakat terutama di daerah endemis malaria tentang manfaat daun sirsak yang memiliki efek melindungi penderita malaria dari malaria serebral.

1.5 ORIGINALITAS PENELITIAN

Tabel 1. Penelitian mengenai *Anona Muricata*, Apoptosis sel limpa

NO	JUDUL	METODE	HASIL
1	Heterogeneous and tissue-specific regulation of effector T cell responses by IFN-gamma during <i>Plasmodium berghei</i> ANKA infection (Villegas-Mendez, A. <i>et al</i> ,2011) ⁵³	Sel T CD4+ dan sel T CD8+ mencit C57BL/6 WT dan C57BL/6 KO IFN- γ yang diinfeksi PbA	Pengamatan Ki67 menunjukkan awal infeksi IFN- γ tidak berpengaruh pada proliferasi sel TCD4+ dan sel TCD8+. Pengamatan CD69 menunjukkan IFN- γ diperlukan untuk aktivasi sel TCD4+ dan sel TCD8+ sejak awal infeksi dan terlihat nyata di hari 5 infeksi PbA. Pengamatan granzyme menunjukkan IFN- γ diperlukan untuk ekspresi granzyme terlihat nyata pada hari 7 infeksi PbA. Ekspresi CTLA4 sel T CD4+ lebih rendah pada mencit KOIFN- γ yang diinfeksi PbA dibanding mencit WT. Kontraksi sel TCD4+ dan sel TCD8+ hari 7 infeksi PbA lebih rendah pada mencit KOIFN- γ dibanding mencit WT
2	Reduce Spleen-IFN-gamma; Correlated with CXCL9 Levels During Cerebral	Perlakuan EDAM pada mencit albino swiss webster dengan infeksi	Produksi IFN- γ sel limpa <i>ex-vivo</i> lebih rendah dan perbedaan ini bermakna pada

	Malaria Phase in Annona muricata-Treated Swiss Mouse Study (Djamiatun et al., 2017b) ⁵⁰	berat PbA. Pemeriksaan yang digunakan Elisa sitokin.	mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Perlakuan EDAM tidak berpengaruh pada produksi IFN- γ sel limpa mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA.
3	Annona muricata Associated with Increase Phytohemagglutinin Induced Spleen IL-10 Production of Swiss Mice During Cerebral Malaria Phase. (Djamiatun et al., 2017) ²²	Perlakuan EDAM pada mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Pemeriksaan yang digunakan Elisa sitokin.	Perlakuan EDAM tidak berpengaruh pada produksi IL-10 sel limpa mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Produksi IL-10 tersebut walaupun demikian masih lebih rendah dari kontrol sehat.
4	Splenocyte apoptosis in Plasmodium berghei ANKA infection: possible role of TNF-alpha and TGF-beta (Keswani and Bhattacharyya, 2013) ⁷	Mencit swiss albino yang diinfeksi PbA.	Pengamatan Evans blu dan annexin V menunjukkan bahwa TGF- β menghambat perburukan apoptosis sel limpa sebaliknya TNF- α meningkatkan jumlah sel limpa yang apoptosis pada mencit dengan infeksi PbA. Apotosis melalui jalur mitokondria tidak terbukti pada infeksi PbA. Peningkatan ekspresi FasL ditemukan pada limpa mencit dengan infeksi PbA. Ekspresi TNFR tidak meningkat di limpa mencit dengan infeksi PbA.
5	CXCL10 contributes to p38-mediated apoptosis in primary T lymphocytes in vitro (Sidahmed et al., 2012) ⁵⁴	Studi <i>in vitro</i> lekosit manusia relawan sehat.	CXCL10 bersama IL-2 dan atau IFN- α menginduksi ekspresi Caspase-3 pada sel T donor manusia sehat. CXCL10 menghambat kerja antiapoptosis Bcl2.
6	Annona muricata effect towards spleen-CXCL10 during severe malaria infection of	Perlakuan EDAM pada mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Pemeriksaan yang digunakan IHC	Ekspresi CXCL10 tidak meningkat pada limpa mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Pemberian EDAM tidak berpengaruh

	Plasmodium berghei ANKA in swiss mice (Albakoush et al., 2017) ⁵¹	terhadap CXCL10.	pada ekspresi CXCL10 limpa mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA.
7	Annona muricata increase IL-27, CXCL12 levels and spleen-white-pulp-diameter in severe malaria (Djamiatun et al., 2018) ⁵²	Perlakuan EDAM pada mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Pemeriksaan yang digunakan Elisa sitokin.	Diameter pulpa putih tidak meningkat pada limpa mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA. Pemberian EDAM berpengaruh pada diameter pulpa putih limpa mencit albino swiss webster dengan infeksi berat PbA.

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang telah dilakukan (tabel.1) adalah pengamatan pada petanda yang terlibat pada jalur apoptosis yaitu ekspresi caspase 8 dan caspase 3 pada sel limpa mencit yang diinfeksi PbA. Penelitian sebelumnya mengamati peran *A.muricata* sebagai imunomodulator pada malaria berat dilihat dari sitokin-sitokin yang terlibat, seperti IFN- γ , TNF-alpha, TGF-beta dan IL-10. Selain itu juga beberapa kemokin yang terlibat seperti CXCL10, CXCL12.