

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Definisi dan Etiologi

Malaria merupakan penyakit infeksi tropis yang diakibatkan oleh protozoa genus *Plasmodium*. *Plasmodium* adalah parasit intraseluler dengan habitat eritrosit. Penyakit ini ditularkan pada manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina (Brooks, *et al.*, 2004; Gosling, 2005). Spesies *P. falciparum* yang telah ditemukan dapat menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium ovale* (*P. ovale*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), dan *P. falciparum* (Staf Pengajar Departemen FKUI Jakarta, 2008).

Pada era biologi premolekular, hanya 4 (empat) spesies *Plasmodium* tersebut yang dapat menginfeksi manusia, namun setelah berkembangnya teknologi molekular, terdapat spesies *Plasmodium* kelima yang dapat menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*). *Plasmodium knowlesi* menjadi penyebab 70% kasus malaria yang membutuhkan rawat inap di Sarawak, Malaysia Borneo. Parasit *P. knowlesi* pada eritrosit manusia sulit dibedakan dengan *P. malariae* dengan menggunakan mikroskop sehingga sering terjadi salah diagnosis penyebab malaria. *Plasmodium knowlesi* dapat menyebabkan malaria berat hingga kematian sedangkan *P. malariae* umumnya hanya menyebabkan malaria ringan (Singh *et al.*, 2004; Daneshvar *et al.*, 2009).

2.1.2 Siklus Hidup Plasmodium dan Patofisiologi Malaria

Terdapat dua tahap perkembangan penyakit malaria, yaitu tahap preeritrositik dan tahap eritrositik. Tahap preeritrositik adalah tahap terjadinya

infeksi pada sistem hati (liver) manusia. Tahap eritrositik adalah tahap terjadinya infeksi pada eritrosit (Oppendoes, 1997).

Stadium parasit pada kelenjar ludah nyamuk *Anopheles sp.* disebut sporozoit. Sporozoit dari kelenjar ludah nyamuk yang terinfeksi masuk ke dalam sirkulasi darah manusia pada saat nyamuk *Anopheles sp.* betina menghisap darah manusia. Sporozoit berkembang biak dengan cara membelah diri di dalam parenkim hati manusia dengan cepat. Setelah berkembang menjadi skizon pada stadium hati, skizon pecah dan melepaskan merozoit. Setiap merozoit akan menginfeksi eritrosit. Di dalam eritrosit, merozoit berkembang menjadi gametosit atau skizon stadium eritrosit. Skizon stadium eritrosit akan pecah dan melepaskan merozoit yang dapat menginfeksi eritrosit lainnya. Jika manusia terinfeksi malaria digigit oleh nyamuk *Anopheles sp.*, gametosit akan berkembang di dalam tubuh nyamuk dan menjadi sporozoit kembali. Selanjutnya parasit Plasmodium akan terus berkembang biak dalam eritrosit yang kemudian keluar untuk menginfeksi eritrosit lain yang masih sehat (Crutcher & Hoffman, 1996).

Gejala dan tanda awal malaria berhubungan dengan pecahnya eritrosit ketika skizon stadium eritrosit matur. Material parasit yang dilepaskan menstimulasi respons imun. Sitokin, oksigen reaktif, dan produk seluler dilepaskan sebagai akibat dari respons imun. Hal tersebut menyebabkan timbulnya demam, menggigil, berkeringat, lemas, dan gejala sistemik lain yang berhubungan dengan malaria (Crutcher & Hoffman, 1996).

Walaupun sebenarnya sistem limpa manusia bisa menghancurkan eritrosit yang terinfeksi oleh parasit, tetapi *P. falciparum* dapat membuat eritrosit terinfeksi menempel pada pembuluh darah kecil dengan cara melepaskan protein adhesin. Protein adhesin tersebut merupakan varian *Plasmodium falciparum* Erythrocyte

Membrane Protein 1 (PfEMP1). PfEMP1 diekspresikan pada membrane eritrosit terinfeksi. PfEMP1 merupakan molekul immunogenic yang merangsang respon antibody yang berperan dalam imunitas. Dengan cara ini eritrosit yang terinfeksi tidak masuk kedalam sistem limpa untuk dihancurkan. Selain itu dengan kemampuan inilah *P. falciparum* sering menjadi malaria berat karena secara simultan dapat terjadi penyumbatan peredaran darah ke otak yang sering mengakibatkan kondisi koma pada penderita penyakit malaria (Buffet, 2011).

2.2 Malaria Plasenta

2.2.1 Pengertian

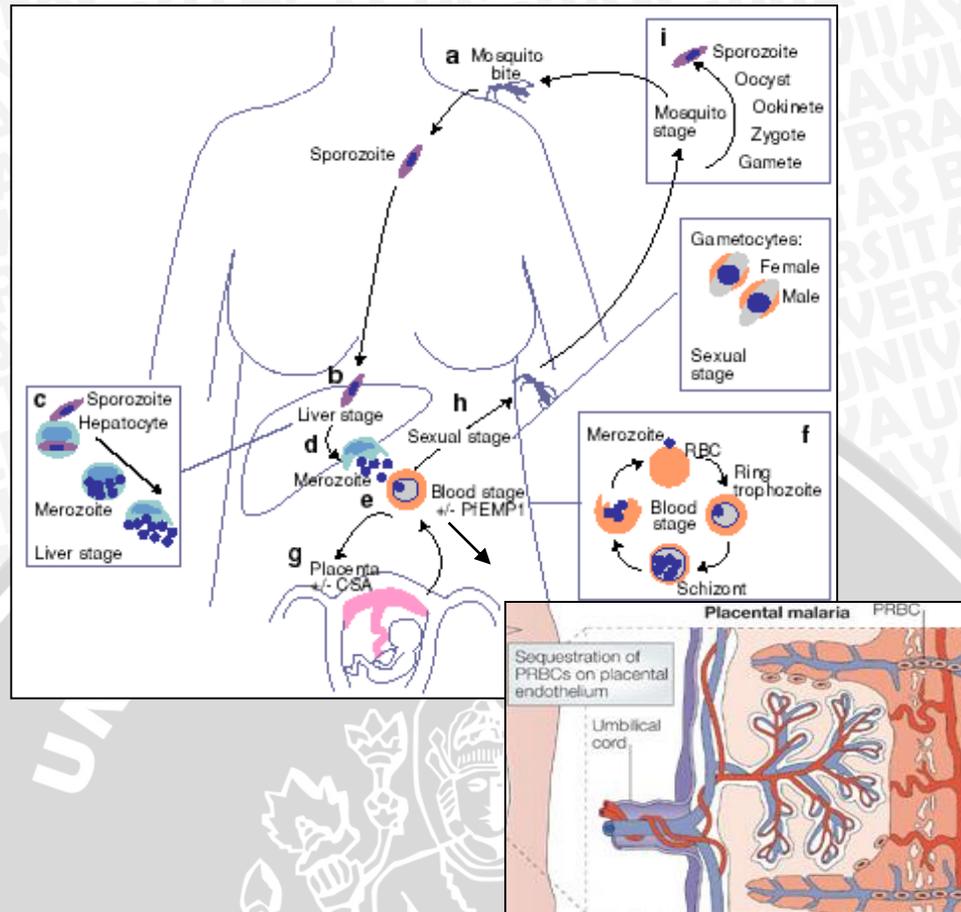
Pada kehamilan, terjadi supresi sistem imun baik humoral maupun seluler untuk menghadapi fetus agar tidak dianggap sebagai benda asing. Hal tersebut mempermudah parasit Plasmodium menginfeksi tubuh selama kehamilan. Apabila *P. falciparum* membentuk sekuestrasi pada vaskular plasenta disebut malaria plasenta. Malaria plasenta dapat menyebabkan manifestasi klinis pada ibu dan janinnya (Samak, 2004).

Malaria dapat bermanifestasi sebagai malaria berat dan menimbulkan berbagai macam komplikasi. Resiko terjadi komplikasi malaria yang berat dan mengancam jiwa terutama terjadi pada wanita yang mengalami kehamilan pertama dan kedua. Komplikasi maternal tersebut meliputi hipoglikemia, anemia berat, edema paru, gagal ginjal akut, malaria cerebral, hiperpireksia, dan perdarahan. Komplikasi tersebut terutama disebabkan oleh mekanisme sekuestrasi yang terjadi pada infeksi *P.falciparum* (CDC, 2012; Gitau, 2005).

2.2.2 Patofisiologi Malaria Plasenta

Variasi hipotesis telah berkembang untuk menjelaskan patofisiologi malaria pada kehamilan. Salah satu hipotesis yang berkembang bahwa proses infeksi Plasmodium yang terjadi pada kehamilan disebabkan oleh 2 faktor utama yaitu supresi sistem imun pada kehamilan dan sekuestrasi eritrosit terinfeksi pada plasenta (Julliana & Nawal, 2009).

Plasmodium falciparum dapat memodifikasi permukaan eritrosit yang terinfeksi sehingga eritrosit tersebut dapat melekat ke endotel kapiler organ-organ tertentu. Hal ini disebut dengan *sekuestrasi* (Staf Pengajar Departemen FKUI Jakarta, 2008). Selama perkembangannya di dalam eritrosit, *Plasmodium falciparum* mengekspresikan protein ligan adesi pada membran eritrosit seperti *Plasmodium falciparum*-infected *erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1). *Plasmodium falciparum*-infected *erythrocyte membrane protein 1* memediasi adesi eritrosit terinfeksi pada jaringan tubuh penderita sehingga terjadi sekuestrasi eritrosit pada beberapa jaringan termasuk plasenta. *Plasmodium falciparum*-infected *erythrocyte membrane protein 1* memiliki spesifitas terhadap berbagai macam ligan termasuk *Chondroitin Sulfat A* (CSA) yang terdapat pada syncytiotrophoblast plasenta (Gambar 2.1.g). *Plasmodium falciparum*-infected *erythrocyte membrane protein 1* juga memungkinkan parasit untuk berikatan dengan reseptor yang diekspresikan oleh sel endotel pada *vascular bed* beberapa organ seperti otak, paru, dan plasenta (Gambar 2.1.e). Sekuestrasi tersebut merupakan mekanisme parasit untuk menghindari destruksi eritrosit terinfeksi oleh limpa (Hviid, 1998; Schofield & Grau, 2005).



Gambar 2.1 Siklus Hidup *Plasmodium falciparum* pada Wanita Hamil
 Infeksi Malaria pada kehamilan diawali (a) injeksi sporozoit ke dalam darah saat nyamuk *Anopheles* menghisap darah manusia. Dalam beberapa menit (b) sporozoit menginvasi dan bermultiplikasi di sel hepatosit. Setelah 10-12 hari, (d) ribuan merozoit dilepaskan ke sirkulasi darah dan (e) menginvasi sekaligus (f) bermultiplikasi di dalam eritrosit. Setelah 48 jam, eritrosit terinfeksi ruptur dan melepaskan merozoit baru yang dapat menginvasi eritrosit baru. Parasit mengekspresikan PfEMP1 yang menyebabkan eritrosit dapat melekat pada jaringan penderita. Salah satu reseptor dari jaringan plasenta yang berikatan dengan PfEMP adalah CSA (g). (h) Beberapa merozoit berdiferensiasi menjadi gametosit yang ditransmisikan ke nyamuk betina saat menghisap darah penderita. (Hviid, 1998; Schofield & Grau, 2005)

2.3 Immunopatologi pada Malaria Plasenta

Malaria plasenta terjadi akibat mekanisme sekuestrasi pada plasenta. Sekuestrasi merupakan faktor utama penyebab berbagai komplikasi pada malaria selama kehamilan, salah satunya bayi berat lahir rendah (BBLR). Berkumpulnya parasit pada endotel kapiler plasenta menyebabkan timbulnya reaksi inflamasi. Terjadi infiltrasi monosit ke dalam ruang intervulus plasenta serta sekresi sitokin



dan kemokin pro-inflamasi. Selain terjadi proses inflamasi, disregulasi faktor angiogenesis juga berperan dalam perkembangan BBLR pada malaria plasenta (Silver *et al.*, 2011). Inflamasi yang terjadi juga dapat menyebabkan anemia maternal, bayi prematur, dan *intrauterine growth restriction* (IUGR). Selain itu, sekuestrasi eritrosit terinfeksi pada plasenta dapat menstimulasi sel beta pankreas penghasil insulin sehingga menyebabkan hiperinsulinemia dan hipoglikemia (Julliana & Nawal, 2009).

2.3.1 Respons Imun

Respons imun spesifik terdiri dari imunitas seluler yang dilaksanakan oleh limfosit T dan imunitas humoral yang dilaksanakan oleh limfosit B. Limfosit T dibedakan menjadi limfosit T helper (CD4+) dan sitotoksik (CD8+) sedangkan berdasarkan sitokin yang dihasilkannya dibedakan menjadi subset Th-1 yang menghasilkan *Interferon gamma*(IFN γ) dan *Tumour necrosis Factor* (TNF α) dan subset Th-2 yang menghasilkan Interleukin (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Sitokin tersebut berperan mengaktifkan imunitas humoral. Sel CD4+ berfungsi sebagai regulator dengan membantu produksi antibodi dan aktifasi fagosit-fagosit lain sedangkan CD8+ berperan sebagai efektor langsung untuk fagositosis parasit dan menghambat perkembangan parasit dengan menghasilkan IFN γ . (Suparman & Alloysius, 2004).

Epitop-epitop antigen parasit akan berikatan dengan reseptor limfosit B yang berperan sebagai sel penyaji antigen kepada sel limfosit T dalam hal ini CD4+. Selanjutnya sel T akan berdeferensiasi menjadi sel Th-1 dan Th-2. Sel Th-2 akan menghasilkan IL-4 dan IL-5 yang memacu pembentukan Imunoglobulin (Ig) oleh limfosit B (Gambar 2.2). Imunoglobulin tersebut juga meningkatkan

kemampuan fagositosis makrofag melalui opsonisasi. Sel Th menghasilkan IFN γ dan TNF α yang mengaktifkan komponen imunitas seluler seperti makrofag dan monosit serta sel NK (Suparman & Alloysius, 2004).

Wanita hamil memiliki kemungkinan terserang malaria falsiparum lebih sering dan lebih berat dibandingkan wanita tidak hamil. Konsentrasi eritrosit yang terinfeksi parasit banyak ditemukan di plasenta sehingga diduga respons imun terhadap parasit di bagian tersebut mengalami supresi. Hal tersebut berhubungan dengan supresi sistem imun baik humoral maupun seluler selama kehamilan sehubungan dengan keberadaan fetus sebagai “benda asing” di dalam tubuh ibu (Suparman & Alloysius, 2004).

Supresi sistem imun selama kehamilan berhubungan dengan keadaan hormonal. Konsentrasi hormon progesteron yang meningkat selama kehamilan berefek menghambat aktivasi limfosit T terhadap stimulasi antigen. Selain itu efek immunosupresi kortisol juga berperan dalam menghambat respons imun (Suparman & Alloysius, 2004).

2.3.2 Peranan Sitokin

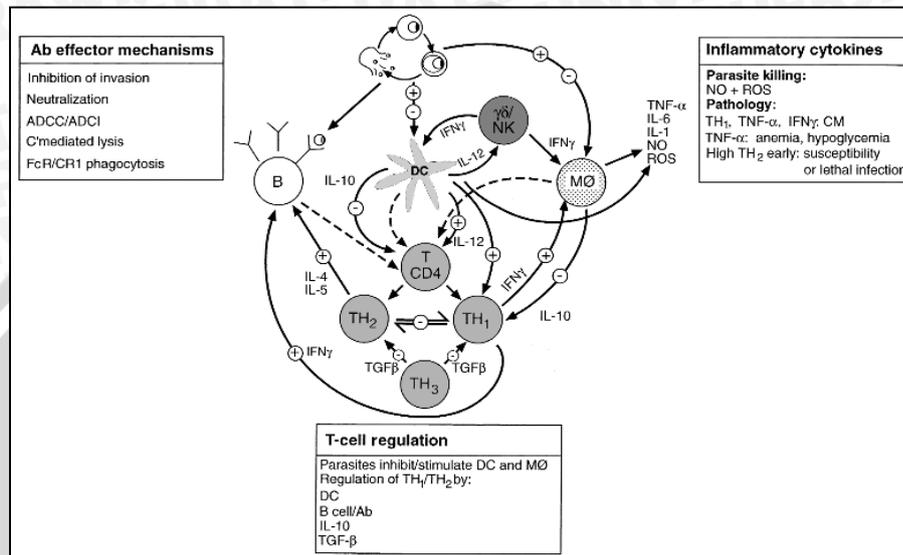
Antigen-antigen parasit merupakan pemicu pelepasan zat-zat dari sel-sel pertahanan tubuh yang disebut sitokin. Sitokin dihasilkan oleh makrofag/monosit dan limfosit T, sitokin yang dihasilkan oleh makrofag adalah TNF, IL-1 dan IL-6 sedangkan limfosit T menghasilkan IFN γ , IL-4, IL-8, IL-10 dan IL-12 (Gambar 2.2). Sitokin yang diduga banyak berperan pada mekanisme patologi dari malaria adalah TNF α . *Tumour necrosis Factor- α* menginduksi terjadinya perubahan pada netrofil yaitu pelepasan enzim lisosomal, ekspresi reseptor permukaan seperti reseptor Fc dan integrin, agresivitas dan adhesi kemotaktik. Selanjutnya terjadi peningkatan daya adheren sel netrofil terhadap berbagai substrat dan sel sehingga

daya bunuh netrofil terhadap parasit meningkat. Selain itu TNF α juga memacu pembentukan sitokin lain seperti IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ dan meningkatkan sintesis prostatglandin. *Tumour necrosis Factor* - α juga meningkatkan ekspresi molekul adhesi seperti *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM)-1 dan CD 36 pada sel-sel endotel kapiler sehingga meningkatkan sitoaderen eritrosit yang terinfeksi parasit. Peningkatan sitoaderen tersebut meningkatkan risiko malaria serebral. IFN γ memacu pembentukan TNF α dan juga meningkatkan daya bunuh netrofil. Interleukin-1 bekerja sinergis dengan TNF α , sedangkan IL-6 memacu produksi Immunoglobulin oleh sel limfosit B dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel limfosit T (Islamuddin, 2010).

Selain berperan pada mekanisme patologi malaria, sitokin juga diduga berperan menyebabkan gangguan pada kehamilan. Pada wanita hamil yang menderita malaria terdapat kenaikan TNF α , IL-1 dan IL-8 yang sangat nyata pada jaringan plasenta dibanding wanita hamil yang tidak menderita malaria. Sitokin-sitokin tersebut dihasilkan oleh makrofag yang terdapat di plasenta (Islamuddin, 2010).

Kadar TNF α yang tinggi dapat meningkatkan sitoaderen eritrosit yang terinfeksi parasit terhadap sel-sel endotel kapiler. Kadar TNF α plasenta yang tinggi akan memacu proses penempelan eritrosit berparasit pada kapiler plasenta dan selanjutnya akan menimbulkan gangguan aliran darah plasenta dan akhirnya gangguan nutrisi janin. Bila proses berlanjut dapat menyebabkan retardasi pertumbuhan janin sehingga bayi yang dilahirkan memiliki berat badan rendah. Selain itu peningkatan sintesis prostatglandin seiring dengan peningkatan TNF α plasenta diduga dapat menyebabkan kelahiran prematur. Beberapa penelitian

menyebutkan bahwa selain kenaikan TNF α , IL-1 dan IL-8 selama kehamilan juga didapatkan peningkatan IL-2, IL-4 dan IL-6 (Islamuddin, 2010).



Gambar 2.2 Respons imun dan produksi sitokin selama infeksi malaria stadium darah

Garis penuh menunjukkan interaksi sitokin dengan efek positif atau negatif pada aktivasi atau diferensiasi sel. Garis putus-putus menunjukkan presentasi antigen dan co-stimulasi oleh APC (*Antigen-Presenting Cells*). (Perlmann & Troye, 2002)

2.3.3 Peran CD8

Sel T CD8 diimplikasikan dalam pertahanan tubuh sebagai respons imun terhadap parasit malaria stadium preeritrosit. Peran CD8 ini belum ditentukan karena perannya pada model mencit masih dalam kontroversi pada pertahanan terhadap parasit stadium liver. Pendapat terdahulu mengatakan bahwa mekanisme aktivasi sel T CD8 menghambat pertahanan tubuh terhadap malaria stadium darah. Hal tersebut disebabkan sel T CD8 distimulasi oleh MHC kelas 1 yang diekspresikan oleh eritrosit. Walaupun begitu, retikulosit atau eritrosit yang imatur mengekspresikan MHC kelas 1 ini dan retikulosit meningkat jumlahnya pada masa kehamilan dan dapat diinfeksi oleh parasit (Kane & Andrew, 2011).



Sel CD8 berpotensi dalam pertahanan tubuh terhadap malaria plasenta sebagai respons terhadap antigen. Sebuah observasi menyebutkan bahwa kenaikan level CD8 pada wanita kehamilan dengan tanpa malaria plasenta dan pembersihan parasit mengindikasikan bahwa terdapat efek anti parasit melalui jalur IFN γ (Kane & Andrew, 2011).

Proteksi mencit terhadap malaria bergantung pada sel CD8 dan mencit memiliki anti-PyCSP IFN γ dan respons sel sitotoksik yang baik. Mencit yang lahir dari induk yang sebelumnya telah terpapar *Plasmodium yoelli* atau diimunisasi vaksin sudah terlindungi dan memiliki respons sel T yang baik (Sedegah *et al.*, 2003).

Eritrosit yang sudah terinfeksi parasit pada kasus malaria serebral tidak terakumulasi pada mencit yang CD8 nya di deplesi. Mencit yang resisten terhadap serebral malaria tidak memiliki Sel T CD8+ di otaknya. Adanya CD8 di otak dibutuhkan untuk perkembangan terjadinya malaria serebral. Dengan deplesi yang dilakukan terhadap CD8 akan melindungi 100% mencit dari malaria serebral (Baptista *et al.*, 2010).

Sel CD8 diduga mengubah lingkungan vaskular dan mempengaruhi status endotelial dengan menginduksi molekul adesi. Sel endotel akan teraktivasi sehingga mengakibatkan terjadinya adhesi parasit pada sel endotel tersebut. Kemudian sel endotel akan mempresentasikan antigen kepada CD8. Ketika berada di otak, CD8 berikatan melalui *T cell receptor* (TCR) dengan antigen parasit yang dipresentasikan oleh MHC pada sel endotel yang teraktivasi. Hal tersebut akan menginduksi CD8 untuk melisiskan sel endotel yang teraktivasi melalui jalur perforin. Akibatnya sel endotel rusak mengakibatkan *blood brain barrier* juga rusak. Kemudian terjadilah akumulasi dari eritrosit terinfeksi. Plasmodium yang

dapat mempengaruhi sel endotel adalah *Plasmodium berghei* ANKA sedangkan *Plasmodium berghei* NK65 tidak memiliki kemampuan dalam mengaktivasi sel endotel (Baptista *et al.*, 2010; Renia *et al.*, 2006).

2.4 Mencit Galur BALB/c

Mencit memiliki ciri-ciri: Mata berwarna merah, kulit berpigmen, berat badan bervariasi, tetapi umumnya pada umur empat minggu berat badan mencapai 18-20 gram. Mencit dewasa dapat mencapai 30-40 gram pada umur enam bulan atau lebih. Mencit sekarang memiliki berbagai warna bulu dan berbagai macam galur (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Plasmodium berghei yang menginfeksi mencit C57BL/6 menghasilkan respons imunitas alamiah yang lebih kuat pada jenis ANKA dibandingkan dengan NK65 dan K173 untuk mencit model malaria plasenta (Duarte *et al.*, 2012).

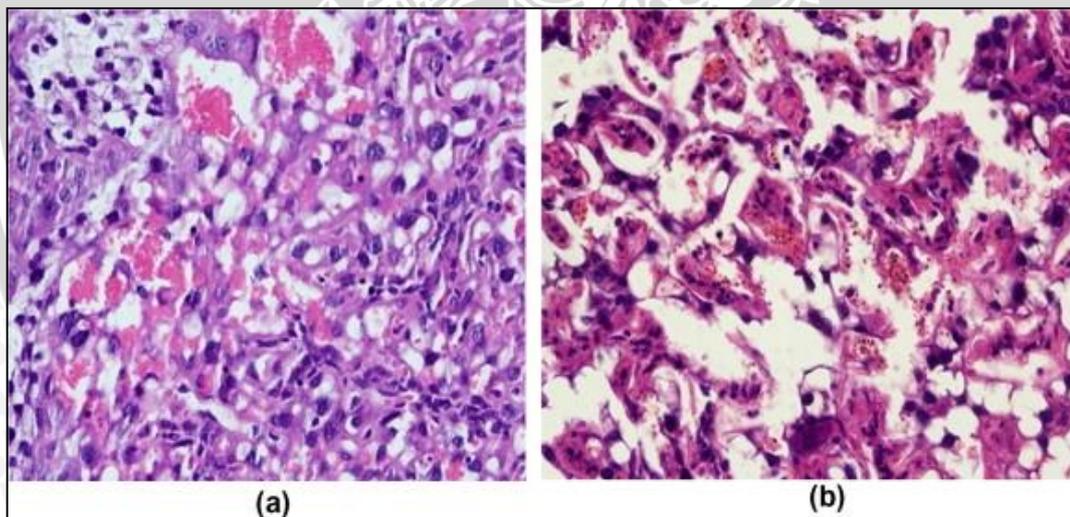
Tabel 2.1 Data Biologis Mencit di Laboratorium

	Karakteristik
Lama hidup	1-2 tahun, bisa sampai 3 tahun
Lama produksi ekonomis	9 bulan
Lama bunting	19-21 hari
Kawin sesudah beranak	1 sampai 24 jam
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	35 hari
Umur dikawinkan	8 minggu (jantan dan betina)
Berat dewasa	20-40 g jantan; 18-35 g betina
Jumlah anak	Rata-rata 6, bisa 15
Suhu (rektal)	35-39oC (rata-rata 37,4oC)
Pernafasan	140-180/menit, turun menjadi 80 dengan anestasi, naik sampai 230 dalam stres
Denyut jantung	600-650/menit, turun menjadi 350 dengan anestesi, naik sampai 750 dalam stress
Tekanan darah	130-160 sistol; 102-110 diastol, turun menjadi 110 sistol, 80 diastol dengan anestesi
Konsumsi oksigen	2,38-4,48 ml/g/jam
Volume Darah	75-80 ml/kg

(Smith dan Mangkoewidjojo, 1988)

Klasifikasi dari mencit galur balb/c adalah, Kerajaan : Animalia, Filum : chordate, Kelas : mamalia, Ordo : Rodentia, Family : muridae, Subfamily: murinae, Genus : mus, dan Spesies: *Mus musculus*.

Model mencit menguntungkan dalam penelitian malaria plasenta. Hal tersebut dikarenakan masa kehamilan mencit yang relatif pendek sehingga memungkinkan untuk dilakukan penelitian dalam jangka waktu pendek. Selain itu, hal tersebut menguntungkan dalam penelitian mengenai imunologi dan genetik (Neres, 2008). Salah satu perbedaan plasenta mencit dan manusia dalam hal penampakan histologi. Gambaran histologi mencit yang berlabirin dapat dilihat pada gambar 2.3 berikut, sedangkan perbandingan kehamilan mencit dan manusia ternagkum dalam tabel 2.2.



Gambar 2.3 Gambaran Histologi Plasenta Mencit

(a) eritrosit yang tidak terinfeksi pada sinusoid plasenta mencit bunting; (b) sinusoid Plasenta dengan eritrosit terinfeksi parasit dan pigmen malaria pada mencit bunting Terinfeksi (Pengecatan Hematoxilin Eosin, 400x) (Sharma, 2012).

Tabel 2.2 Perbandingan Kehamilan Mencit dan Manusia

	Mencit	Manusia
Lapisan Haemochorial	Haemothrichorial Membran trofoblas lapisan ke-II Membran trofoblas lapisan ke-III	Haemomonochorial <i>Microvillous plasma membrane</i> (MVM) pada syncytiotrophoblas <i>Basal Plasma Membrane</i> (BM) pada syncytiotrophoblas
Zona Plasenta	the junctional and labyrinthine zones	Villous zone
Jenis Implantasi	Invasive - Eksentrik Kapiler fetus dan <i>maternal blood space</i> tersusun di labirin	Invasive - Interstitial Vili meluas mencapai <i>maternal blood space</i>
Lama Implantasi		
1. Embrio Masuk ke Uterus	3 hari	3,5 hari
2. Blastosis	3 hari	4,5 hari
3. Implantasi	4,5 hari	7-9 hari
4. Kebuntingan	19-20 hari	270-290 hari
Difusi molekul pada plasenta	<i>paracellular, extracellular water-filled route of exchange</i>	<i>paracellular, extracellular water-filled route of exchange</i>
Jenis Plasenta	Deciduata	Deciduata

(Dilworth, 2012)

2.5 *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei banyak digunakan dalam penelitian dan pengembangan biologi pada parasite malaria untuk manusia. Hal tersebut dikarenakan sudah tersedianya teknologi pembiakan secara *in vitro* dan pemurnian pada tahapan siklus hidup, pengetahuan pada susun genom, dan pengaturannya. Hasil analisis molekuler menunjukna bahwa *Plasmodium berghei* memiliki banyak kesamaan dengan plasmodium yang menginfeksi manusia. Infeksi oleh *Plasmodium berghei* dapat mempengaruhi otak pada tikus laboratorium. Gejala ini untuk tingkat tertentu sebanding dengan gejala malaria serebral pada pasien yang terinfeksi dengan *Plasmodium falciparum*. Oleh karena itu, *Plasmodium berghei*

banyak digunakan pada penelitian malaria yang disebabkan oleh parasite tersebut (Darlina, 2011).

Klasifikasi dari *Plasmodium berghei* adalah Superkingdom: Eukariota, Kingdom: Protozoa, Phylum: Microspora, Kelas: Microsporea, Subkelas: Microsporida, Ordo: Haemosporina, Famili: Plasmodiidae, Genus: Plasmodium, Spesies: *Plasmodium berghei*, dan Galur: *Plasmodium berghei* strain ANKA (Nugroho, 2009).

