

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Penelitian ini merupakan penelitian analitik eksperimental dengan desain penelitian *post test only control group*, untuk mengetahui peran HSP70 dan HMGB1 dalam terjadinya kerusakan ginjal pada model mencit malaria berat. Penelitian ini telah dilakukan pada bulan April hingga Agustus 2014, di Laboratorium Parasitologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini menggunakan parasit *Plasmodium berghei* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan uji yang dipakai adalah mencit galur C57BL/6 berjenis kelamin betina yang diperoleh dari Institut Eijkman Jakarta. Hewan uji dalam penelitian ini dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Konsep penelitian ini adalah *Plasmodium berghei* yang diinokulasikan kedalam tubuh mencit C57BL/6 berkembang biak secara aseksual. Sporozoit masuk ke dalam aliran darah dan memasuki sel-sel parenkim hepar. Sel hepar yang mengandung plasmodium pecah, merozoit keluar, masuk ke eritrosit dan ikut dalam aliran darah menuju ke berbagai organ (keadaan parasitemia).

Permukaan membran eritrosit terinfeksi stadium matur akan mengalami penonjolan dan membentuk knob PfEMP-1. Knob PfEMP1 memediasi melekatnya eritrosit pada reseptor molekul adhesif yang ada pada endotel kapiler dan venula. Peristiwa perlekatan tersebut dikenal sebagai sitoadheren dan menimbulkan terjadinya sekuestrasi. Eritrosit (baik yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi) akan mengalami *rosetting* dan autoaglutinasi, sehingga menyebabkan terjadinya sekuestrasi eritrosit yang mengandung parasit matur

pada pembuluh darah ginjal. Sekuestrasi menyebabkan penurunan aliran darah pada mikrovaskular (iskemia). Iskemia akan menciptakan kondisi stres dan hipoksia yang akan meningkatkan produksi HSP70 dan HMGB1. Iskemia pada ginjal akan menyebabkan nekrosis sel-sel tubulus dan glomerulus sehingga mengakibatkan gagal ginjal akut (GGA).

Pada penelitian ini, digunakan 2 kelompok perlakuan, yaitu kelompok perlakuan yang diinokulasi dengan  $1 \times 10^6$  sel darah merah yang terinfeksi *Plasmodium berghei* secara intraperitoneal dan kelompok kontrol yang tidak dilakukan inokulasi. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor mencit, sehingga total mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah  $2 \times 9 = 18$  ekor. Pengamatan ekspresi HSP70 dan HMGB1 pada jaringan ginjal mencit dilakukan setelah perlakuan selama 14 (empat belas) hari.

### **6.1 Gambaran Histopatologi Ginjal**

Penilaian skor histopatologi dilakukan secara *double blind* oleh 2 orang ahli Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya (Rahmawati, 2015). Gambaran kerusakan glomerulus secara histopatologis yang didapatkan pada kelompok yang diinokulasi *Plasmodium berghei* pada penelitian ini adalah adanya nekrosis pada sel-sel glomerulus, infiltrasi sel-sel radang, proliferasi mesangial, deposisi pigmen hemozoin dan glomerulus sclerosis. Studi literatur menyebutkan gambaran histopatologis malaria pada gagal ginjal akut berupa tubulus nekrosis akut (TNA), nefritis intersisial, dan glomerulonefritis (Rahmawati, 2015). Gambaran glomerulonefritis berupa proliferasi sel glomerulus termasuk sel mesangial, sel endotel, sel podosit, perubahan membran basal, infiltrasi sel radang, pigmen hemozoin, adanya eritrosit yang terinfeksi pada kapiler glomerulus, nekrosis serta deposisi imun kompleks (Sudarat *et al.*, 2007). Proliferasi sel glomerulus kemungkinan

disebabkan respon imun sekunder oleh karena pelepasan sitokin selama infeksi malaria, baik itu oleh sel imun hospes atau parasit malaria (Wichapoon *et al.*, 2014).

## **6.2 Pengaruh Infeksi *Plasmodium berghei* terhadap Ekspresi HSP70 pada Jaringan Ginjal Mencit galur C57BL/6**

Hipotesis pertama penelitian ini adalah terdapat pengaruh inokulasi *Plasmodium berghei* ANKA terhadap ekspresi HSP70. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang bermakna (signifikan) dengan kelompok kontrol ( $p$  Mann Whitney = 0.000,  $p < 0.05$ ), dengan nilai rerata kelompok perlakuan adalah 5.34 dan kelompok kontrol 0.04. Hasil ini sesuai dengan teori, bahwa ekspresi HSP70 pada jaringan ginjal mencit galur C57BL/6 yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Salah satu pathogenesis yang khas dari malaria adalah terjadinya hemolisis. Teori bahwa hemolisis dapat memicu terjadinya stress oksidatif dan aktivasi dari UPR (*Unfolded Protein Receptor*) telah dibuktikan pada penelitian Deuel *et al.*, 2016. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa terjadi peningkatan regulasi gen akibat paparan heme pada ginjal, yang dievaluasi dengan pemeriksaan imunohistologi terhadap HSP70 dan HMOX1, yang menunjukkan peningkatan secara signifikan pada sel-sel tubulus proksimal.

Kembali kepada pathogenesis hemolisis, pelepasan hemoglobin (Hb) bebas menyebabkan disfungsi endotel, toksisitas vaskular oksidatif dan gagal ginjal (Schaer *et al.*, 2013). Ada beberapa mekanisme yang diduga menyebabkan terjadinya toksik akibat hemoglobin bebas. Yang pertama, Hb dapat segera berubah menjadi heterodimer yang cukup kecil untuk keluar dari pembuluh darah dan memasuki jaringan, seperti ginjal yang lebih sedikit

mengandung antioksidan daripada darah. Kedua, Hb berinteraksi dengan ligan selain oksigen, seperti NO dan peroksida. Interaksi ini dapat memicu terjadinya kerusakan jaringan oksidatif. Ketiga, ferritin Hb ( $\text{Fe}^{3+}$ ), yang merupakan produk autooksidasi Hb atau reaksi Hb dengan oksidan endogen, dapat melepaskan heme bebas. Heme bebas merupakan pemicu utama peroksidase lipid dan promotor inflamasi. Heme konsentrasi tinggi sendiri, diketahui merupakan pemicu munculnya UPR (Vallellian *et al.*, 2015; Belcher *et al.*, 2014).

Proses tersebut diatas bekerja baik pada hemolisis kondisi fisiologis maupun patologis. Pada kondisi fisiologis, jumlah Hb bebas masih dapat dikendalikan melalui ikatan dengan protein plasma haptoglobin. Namun pada kondisi patologis, satu-satunya jalan untuk membuang Hb bebas dari sirkulasi adalah melalui filtrasi glomerulus, sehingga selama beberapa saat, ginjal terpapar dengan Hb bebas konsentrasi tinggi, yang dapat menyebabkan terjadinya gagal ginjal akut (GGA). Mekanisme kerusakan ginjal ini diduga akibat kerusakan langsung sel-sel tubulus renalis karena paparan Hb yang terfiltrasi glomerulus (Schaer *et al.*, 2013). Hasil studi Deuel *et al.*, (2016) menunjukkan bahwa paparan Hb bebas konsentrasi tinggi pada ginjal, memicu over ekspresi HMOX1 dan HSP70 pada sel-sel ginjal, terutama sel-sel epitel tubulus.

Overekspresi HSP70 ini merupakan mekanisme protektif dari tubuh untuk perbaikan protein yang rusak, pencegahan agregasi protein yang terdenaturasi, degradasi protein yang rusak, perbaikan DNA, menghambat apoptosis, stabilisasi cytoskeleton, anti inflamasi, stimulasi monosit M2, dan stimulasi aktivitas sel T regulator (Treg) (Aufrecht, 2005). Peran-peran penting HSP70 dalam proteksi inilah yang akan melindungi ginjal dari cedera iskemia yang lebih berat (O'Neill *et al.*, 2014).

### 6.3 Pengaruh Infeksi *Plasmodium berghei* terhadap Ekspresi HMGB1 pada Jaringan Ginjal Mencit galur C57BL/6

Hipotesis kedua penelitian ini adalah terdapat pengaruh inokulasi *Plasmodium berghei* ANKA terhadap ekspresi HMGB1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang bermakna (signifikan) dengan kelompok kontrol ( $p$  Mann Whitney = 0.000,  $p < 0.05$ ), dengan nilai rerata kelompok perlakuan adalah 4.44 dan kelompok kontrol 0.09. Hasil ini sesuai dengan teori, bahwa ekspresi HMGB1 pada jaringan ginjal mencit galur C57BL/6 yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

*High Mobility Group Box 1* (HMGB1) yang merupakan faktor nuklear yang dilepaskan secara ekstraseluler sebagai sitokin inflamasi, adalah ligan endogen untuk TLR4 (*Toll Like Receptor – 4*). Sampai saat ini, pada kasus malaria, diketahui bahwa penyebab munculnya HMGB1 ada 2, yaitu, yang pertama akibat terjadinya perlukaan, kerusakan, iskemik atau nekrosis jaringan dan yang kedua akibat *encoding genome* dari *Plasmodium*. *Genome Plasmodium* diketahui dapat mengkode 2 jenis HMGB, yaitu HMGB1 dan HMGB2. Dengan pelepasan protein-protein ini dari sel darah merah, diduga hal ini ikut berperan pada pathogenesis terjadinya AKI (Briquet *et al.*, 2015).

Pada studi yang dilakukan Wu *et al.*, (2010), telah dikonfirmasi pada AKI terjadi peningkatan regulasi HMGB1 dan pemberian antibodi anti HMGB1 telah terbukti menunjukkan efek perlindungan yang signifikan dan mengindikasikan adanya potensi terapeutik. Mekanisme HMGB1 dapat menyebabkan kerusakan ginjal, diduga melalui jalur aktivasi sistem imun innate. *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) memicu sinyal seluler dengan berikatan terhadap TLR4. Setelah berikatan dengan TLR4, terjadi aktivasi NFK $\beta$  melalui jalur *MyD88-dependent*

untuk memulai respon inflamasi, dengan pelepasan sitokin dan kemokin proinflamasi (Wu *et al.*, 2010). Selain itu, HMGB1 juga menginduksi profil protrombik pada sel-sel endotel secara langsung. *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) yang dilepas oleh sel-sel iskemia ini akan berkontribusi dalam berkembangnya respon inflamasi dan menyebabkan kerusakan ginjal yang lebih parah (Junhua *et al.*, 2010).

#### **6.4 Hubungan antara Ekspresi HSP70 dan HMGB1**

Hipotesis ketiga penelitian ini adalah terdapat hubungan korelatif antara ekspresi HMGB1 dan HSP70 pada kelompok inokulasi *Plasmodium berghei* ANKA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memiliki korelasi yang bermakna (signifikan) dengan kelompok kontrol ( $p$  Spearman *Correlation* = 0.000,  $p < 0.05$ ), dengan nilai  $R = 1.000$ . berarti hubungan positif, semakin tinggi ekspresi HMGB1, maka semakin tinggi pula ekspresi HSP70, dengan kekuatan hubungan “sangat kuat”.

Protein HMGB1 merupakan molekul protein yang berhubungan dengan kerusakan jaringan (DAMP, *Damage Associated Molecular Protein*) selama proses inflamasi, yang kadarnya dipengaruhi oleh stressor abiotik seperti panas. Saat ada stressor biotik patogenik, HMGB1 berperan dalam aktivasi reseptor imun innate, seperti TLR, sehingga mampu mempengaruhi banyak aspek dari respon imun host. (Norouzitalab *et al.*, 2007)

*High Mobility Group Box 1* (HMGB1) diinduksi dalam monosit/makrofag yang teraktivasi dan juga dilepaskan dari sel-sel yang tertekan dan atau terluka. Studi yang dilakukan Mezajeyan *et al.*, (2007) menemukan bahwa TREM-1 (*Triggering Expressed on Myeloid Cells -1*) merupakan mediator HMGB-1 dalam menginduksi produksi sitokin. Hal ini menunjukkan bahwa HMGB-1 dilepaskan sebagai sinyal bahaya endogen untuk meningkatkan respon proinflamasi dalam

monosit atau makrofag dengan hasil akhir berupa kerusakan ginjal yang lebih berat.

*Heat Shock Protein 70* (HSP70) akan meningkat saat terjadinya stressor biotik patogenik, seperti panas dan iskemia. *Heat Shock Protein 70* (HSP70) merupakan respon kompensasi terhadap peningkatan kadar sitokin pro inflamasi, salah satunya HMGB1. Beberapa studi tentang HSP70 menemukan bahwa peran protektif utama HSP70 adalah sebagai anti inflamasi. *Heat Shock Protein 70* (HSP70) bekerja dengan menginhibisi jalur inflamasi NFK $\beta$ , dimana aktivasi NFK $\beta$  dan translokasi NFK $\beta$  dari sitoplasma dan nukleus akan meningkatkan mediator-mediator pro inflamasi (Senf *et al.*, 2008; Voegeli *et al.*, 2008; Giribaldi *et al.*, 2010), salah satunya adalah HMGB1 (Punsawad, 2013). Hasil ini konsisten dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menemukan bahwa overekspresi protein HSP70 akan menghambat translokasi nukleus NFK $\beta$  dan mengurangi produksi mediator proinflamasi (Hinz *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2006).

Protein ini akan memproteksi ginjal dari kerusakan ginjal yang lebih berat. *Heat Shock Protein 70* (HSP70) bekerja dengan cara memperbaiki protein yang *unfolded*, mencegah agregasi protein yang terdenaturasi, degradasi protein yang rusak, perbaikan DNA, menghambat apoptosis, stabilisasi cytoskeleton, dan anti inflamasi (O'Neill *et al.*, 2014). *Heat Shock Protein 70* (HSP70) akan menghambat respon inflamasi destruktif yang dilakukan oleh makrofag residen di ginjal dan memperbaiki *folding* protein yang salah di dalam ginjal sehingga dapat menghambat kerusakan sel-sel ginjal (Kampinga *et al.*, 2009).

Hubungan langsung diantara keduanya masih belum dapat dipastikan. Pada penelitian lain mengenai induksi HMGB1 dan HSP70, menunjukkan bahwa HSP70 dan HMGB1, diinduksi secara sekuensial, namun mekanisme regulasi pelepasan dan hubungan antar keduanya masih belum diketahui (Norouzitlab *et al.*, 2007).

### **6.5 Hubungan antara Ekspresi HSP70 dan Derajat Parasitemia**

Hipotesis keempat penelitian ini adalah terdapat hubungan antara ekspresi HSP70 dan derajat parasitemia. Akan tetapi, hasil penelitian menggunakan uji korelasi *Spearman* menunjukkan bahwa tidak ada korelasi yang bermakna antara variabel HSP70 dan derajat parasitemia ( $p=0.212$ ,  $R=0.461$ ).

Studi yang dilakukan oleh Elias *et al.*, (2012) mengemukakan bahwa derajat parasitemia, mulai terdeteksi pada hari ketiga dan terus meningkat hingga hari ke-14, yaitu hari terakhir dari waktu penelitian. Sekuestrasi dari eritrosit terinfeksi di siklus aseksual (stadium trofozoit matur dan skizon matur) di mikrovaskular organ-organ vital akan mengganggu mikrosirkulasi dan memiliki peran utama dalam patogenesis malaria. Penghitungan sekuestrasi eritrosit terinfeksi merupakan bukti kuat untuk menilai derajat keparahan penyakit dan kerusakan organ, sedangkan, derajat parasitemia merupakan bukti lemah dari tingkat keparahan dan mortalitas dari malaria sehingga tidak berkaitan dengan tingkat inflamasi dan kerusakan pada organ (Desakorn *et al.*, 2005). Penelitian oleh Dondorp *et al.*, (2005) tentang renal malaria menemukan bahwa tidak terdapat asosiasi antara derajat parasitemia perifer dengan kejadian gagal ginjal akut (GGA).

### **6.6 Hubungan antara Ekspresi HMGB1 dan Derajat Parasitemia**

Hipotesis kelima penelitian ini adalah terdapat hubungan antara ekspresi HMGB1 dan derajat parasitemia. Akan tetapi, hasil penelitian menggunakan uji korelasi *Spearman* menunjukkan bahwa tidak ada korelasi yang bermakna antara variabel HMGB1 dan derajat parasitemia ( $p=0.212$ ,  $R=0.461$ ).

Derajat parasitemia merupakan salah satu bentuk bukti yang sering digunakan untuk menilai terjadinya malaria berat, namun hal tersebut tidak berkaitan dengan pelepasan sitokin dan kemokin pro inflamasi pada organ-organ



vital, salah satunya adalah *High Mobility Group Box-1* (HMGB1). Selain itu, derajat parasitemia tidak berkaitan dengan perbaikan klinis dan keberhasilan terapi pada malaria berat (Higgins *et al.*, 2013). Penghitungan sekuestrasi eritrosit terinfeksi lebih berkorelasi dengan derajat keparahan penyakit dan kerusakan organ dibandingkan dengan derajat parasitemia (Desakorn *et al.*, 2005).

### **6.7 Peran HSP70 dalam Terjadinya Kerusakan Ginjal pada Malaria Berat**

*Heat Shock Protein 70* (HSP70) terbukti memiliki peran dalam terjadinya kerusakan ginjal akibat malaria berat pada penelitian ini. Pada penelitian ini terlihat ekspresi HSP70 pada intraselular (nukleus dan sitoplasma) dan ekstraselular (interstisial). Ekspresi pada intraselular lebih tinggi dibandingkan pada ekstraselular. Hasil ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa HSP70 diekspresikan lebih banyak di intraselular (nukleus dan sitoplasma) dibandingkan ekstraselular (O'Neill *et al.*, 2014). Pada saat terjadinya kerusakan ginjal pada malaria terdapat banyak kerusakan struktur protein serta pembentukan UPR, proliferasi matriks yang terlalu tinggi, dan ketidakstabilan sitoskeleton akibat hilangnya polaritas protein (Deuel *et al.*, 2016). Akumulasi protein yang rusak dan UPR menyebabkan terjadinya stres pada retikulum endoplasma (Inagi, 2010).

Kerusakan ginjal akibat protein yang mengalami kerusakan dan *misfolding* akan memicu pelepasan dari HSP70 sebagai mekanisme protektif yang akan memperbaiki protein dan berfungsi dalam *cell survival* (Aufrecht, 2005). Semakin tinggi kerusakan ginjal, maka pelepasan HSP70 juga semakin meningkat. Apabila proses perbaikan stres dan kerusakan pada ginjal dapat berespon dengan baik oleh HSP70, maka akan terjadi *cell survival*. Akan tetapi, jika tubuh tidak dapat berespon dengan baik terhadap HSP70 karena proses kerusakan atau infeksi yang terlalu berat, maka akan terjadi mekanisme

apoptosis dan nekrosis sel. Ekspresi HSP70 yang meningkat signifikan terutama di intraselular menunjukkan peran HSP70 pada malaria berat pada ginjal (Kolomets *et al.*, 2013).

### **6.8 Peran HMGB1 dalam Terjadinya Kerusakan Ginjal pada Malaria Berat**

HMGB1 terbukti memiliki peran dalam terjadinya kerusakan ginjal akibat malaria berat pada penelitian ini. Pada penelitian ini terlihat ekspresi HMGB1 pada intraselular (nukleus dan sitoplasma) dan ekstraselular (interstisial). Ekspresi pada intraselular lebih tinggi dibandingkan pada ekstraselular. Hasil ini berbeda dengan teori yang menyebutkan bahwa pada kondisi *Acute Kidney Injury* (AKI), HMGB1 akan dilepaskan dalam jumlah besar ke ekstraselular oleh sel-sel yang mengalami nekrosis untuk meningkatkan inflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi P53 dan P65 pada jalur klasik NFK $\beta$  (Juan *et al.*, 2016). Banyaknya HMGB1 yang masih terekspresi di intraselular pada kerusakan ginjal malaria berat dapat menjadi penemuan baru yang menunjukkan perbedaan mekanisme HMGB1 pada *Acute Kidney Injury* dan pada kerusakan ginjal akibat malaria berat.

Perbedaan mekanisme pelepasan HMGB1 pada *Acute Kidney Injury* secara umum dan pada malaria berat dapat disebabkan oleh jalur pelepasan HMGB1 ke ekstraselular pada malaria berat yang tidak teraktivasi, waktu infeksi yang masih belum cukup lama untuk menstimulasi pelepasan HMGB1 ke ekstraselular, dan ekspresi HMGB1 yang memang lebih banyak berada di nukleus dan sitoplasma pada saat keadaan malaria berat (Leelahavanichkul *et al.*, 2011).

HMGB1 yang terekspresi di nukleus menunjukkan perannya sebagai stabilisator nukleosom dengan cara berikatan dengan histon dan membantu proses transkripsi di nukleus untuk dapat memicu proliferasi sel-sel pro inflamasi.

HMGB1 yang terekspresi di sitoplasma menunjukkan perannya dalam proses translokasi P53 dan P65 dari sitoplasma ke nukleus yang juga akan memicu proliferasi sel-sel pro inflamasi (Penzo *et al.*, 2010). Selain itu, ekspresi HMGB1 di nukleus dan sitoplasma juga menunjukkan peran HMGB1 dalam proses apoptosis dan nekrosis. Ekspresi HMGB1 yang meningkat signifikan di intraselular dan ekstraselular ini menunjukkan peran HMGB1 pada malaria berat pada ginjal (Junhua *et al.*, 2010).

### **6.9 Keterbatasan Penelitian**

Pada penelitian ini, ekspresi HSP70 dan HMGB1 hanya diamati secara lokal di organ ginjal saja, tidak di organ lain maupun sistemik sehingga ekspresi kedua marker tidak bisa diamati secara keseluruhan pada hewan coba. Keterbatasan selanjutnya adalah gambaran sekuestrasi sebagai bukti terjadinya malaria berat pada organ ginjal. Gambaran sekuestrasi pada hasil histopatologi ginjal mencit C57BL/6 sangat minimal dan berbeda dengan gambaran sekuestrasi yang terlihat jelas pada manusia.

Selain itu, dua ekor mencit C57BL/6 dengan malaria berat pada ginjal yang dieksklusi karena kematian sebelum hari ke-14 tidak ikut diteliti dan dibandingkan dengan mencit C57BL/6 yang memenuhi kriteria inklusi, sehingga tidak diketahui penyebab kematian pada kedua mencit tersebut. Secara umum keterbatasan pada penelitian ini adalah mengenai evaluasi status mencit sebelum dikorbankan. Evaluasi status fungsi ginjal (Ureum, Creatinine) seharusnya dilakukan setiap hari, terutama hari ke-1 dan hari ke-14. Selain itu, indikator gagal ginjal akut (GGA) yang lain seperti *urine output* dan *Glomerulus Filtration Rate* tidak diukur pada kedua kelompok mencit.