



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria disebabkan oleh infeksi *Plasmodium* dan ditularkan oleh nyamuk *Anopheles*, masih merupakan masalah kesehatan Indonesia dan dunia hingga kini. Malaria merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian di banyak daerah di dunia. World Health Organization (WHO) memperkirakan bahwa setengah dari populasi dunia tengah beresiko tertular malaria. Setiap tahun terdapat sekitar 250 juta kasus malaria dan terjadi hampir 1 juta kematian akibat malaria. Malaria tetap endemik pada 109 negara, termasuk Indonesia (WHO, 2009).

Terdapat empat spesies *Plasmodium* yang menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae* (Perkins dkk., 2011). Infeksi *P. falciparum* dapat berkembang menjadi malaria berat. Manifestasi klinis malaria berat adalah malaria serebral, anemia berat, hiperparasitemia, hipoglikemia, asidosis laktat dan distres respirasi (Perkins dkk., 2011). Anemia berat dan malaria serebral merupakan komplikasi utama yang menyebabkan kematian akibat malaria (Martiney dkk., 2000; Risadi dan Rodriguez-Sosa, 2011).

Anemia berat akibat malaria (*Severe Malaria Anemia/SMA*) merupakan masalah kesehatan utama di negara berkembang. Sebanyak 3-4% pasien malaria pada anak di Afrika yang menjalani rawat inap di rumah sakit karena SMA. Prevalensi dan *case fatality rate* SMA di Afrika adalah 21,2% dan 8,4% (Perkins dkk., 2011).

Patogenesis anemia pada malaria adalah kompleks dan multifaktorial dan sampai saat ini belum sepenuhnya diketahui (Martiney dkk., 2000; McDevitt dkk., 2006). Anemia pada malaria merupakan akibat proses patologis yang mengakselerasi destruksi eritrosit dan menghambat produksi eritrosit baru (McDevitt dkk., 2006). Anemia pada malaria disebabkan oleh peningkatan destruksi eritrosit/eritrofagositosis, baik eritrosit terinfeksi maupun eritrosit normal, penurunan produksi eritrosit dan diseritropoesis sumsum tulang. Namun anemia berat dapat terjadi pada parasitemia rendah, infeksi kronis dan setelah eliminasi parasit menggunakan obat anti malaria. Beberapa mekanisme yang terlibat dalam patogenesis anemia pada malaria ternyata tidak cukup menjelaskan keparahan dan tingkat anemia malaria (Martiney dkk., 2000; McDevitt dkk., 2006). Pada produksi eritropoetin yang cukup, dapat terjadi supresi eritropoesis pada beberapa kasus anemia berat (Martiney, 2000).

Meskipun berperan penting dalam klirens parasit, aktivasi sel imun dan produksi sitokin proinflamasi dapat berperan pada patogenesis SMA melalui penghambatan eritropoesis dan pengurangan *survival* eritrosit (Awandare, 2007). Menurut peneliti lain salah satu penyebab penting gangguan eritropoesis pada anak dengan SMA disebabkan oleh ketidak-seimbangan mediator inflamasi (Perkins dkk., 2011). Disregulasi jalur imunologis host pada infeksi malaria menyebabkan supresi eritropoesis selama infeksi malaria. Tergantung pada jumlah dan saat mediator inflamasi dilepas, maka respon imun terhadap malaria dapat mengontrol parasitemia. Jika terjadi ketidak seimbangan pada *milleu* inflamasi dapat menginduksi kerusakan host, termasuk supresi respon eritropoetik

(McDevitt dkk., 2006; Awandare, 2007; Laminkara dkk., 2007; Perkins dkk., 2011).

Clark dkk menduga bahwa anemia berat dan malaria serebral mungkin disebabkan oleh pelepasan sitokin proinflamasi oleh makrofag host sebagai respon terhadap parasit malaria dan produk yang dikeluarkan oleh parasit malaria tersebut (Martiney dkk., 2000). Lisis eritrosit yang diperantarai sel-sel imun, fagositosis, dan sekuestrasi berkontribusi pada peningkatan klirens eritrosit normal dan eritrosit terinfeksi di dalam limpa (McDevitt dkk., 2006).

Salah satu sitokin proinflamasi yang diduga berperan dalam patogenesis anemia pada malaria adalah *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF). MIF adalah molekul efektor penting pada sistem imun innate (Calandra dan Roger, 2003) karena mempunyai perangkat proinflamasi poten yang penting untuk respon innate dan adaptif terhadap infeksi bakteri dan parasit (Perkins dkk., 2011).

MIF adalah komponen integral respon inflamasi host (Calandra dan Roger, 2003; Risadi dan Rodriguez-Sousa, 2011). MIF adalah sitokin ubikuitus, banyak terdapat di dalam sel dan di luar sel, karena diproduksi oleh berbagai sel, antara lain sel imun, seperti makrofag dan limfosit, epitel dan endokrin (Risadi dan Rodriguez-Sousa, 2011). MIF yang diproduksi oleh makrofag disimpan dalam bentuk setengah jadi (*preformed*) di dalam vakuola makrofag. Pelepasan MIF diinduksi oleh infeksi bakteri dan parasit, sitokin dan kadar glukokortikoid. MIF mempunyai efek autokrin dan parakrin, sehingga MIF yang telah dilepas makrofag akan difagositosis kembali oleh makrofag untuk memulai aksi proinflamasi dengan berikatan dengan salah satu reseptor MIF, yaitu CD74 yang merupakan bentuk permukaan sel *Major Histo Compatibility Complex* (MHC)

class II. Selanjutnya MIF akan merangsang makrofag mengeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi seperti *Tumor necrosis factor* (TNF) α , *nitric oxide* (NO), *interferon* (IFN) γ dan *interleukin-12* (IL-12) melalui aktivasi *extracellular regulated kinase* (ERK) 1-2. MIF dapat menginduksi pelepasan molekul proinflamasi lain seperti asam arakidonat dan eikosanoid melalui jalur fosfolipase A2 dan siklooksigenase. Selain itu MIF juga menginduksi upregulasi *Toll-like receptor* (TLR)-4 dan molekul adesi pada makrofag. MIF mempunyai efek eksokrin yaitu menginduksi kemotaksis dan proliferasi leukosit (Calandra dan Roger, 2003; Leng dan Bucala, 2006; Zierow, 2006; Risadi dan Rodriguez-Sosa, 2011; Bozza dkk., 2012).

MIF menunjukkan jangkauan aktivitas imunitas dan inflamasi yang luas, dapat secara langsung atau tidak langsung meningkatkan produksi dan/atau ekspresi sejumlah besar molekul proinflamasi dan dapat bertindak sinergis dengan IFN γ , TNF- α dan/atau IL-12, berperan pada patogenesis anemia. MIF kadar tinggi menginduksi makrofag untuk mensekresi TNF- α dan sinergis dengan IFN γ untuk meningkatkan produksi NO oleh makrofag (Calandra dan Roger, 2003; Martiney dkk., 2000; Risadi dan Rodriguez-Sosa, 2011).

Namun hingga kini masih terdapat kontroversi tentang peran MIF dalam patogenesis anemia pada malaria. Martiney mengemukakan hipotesis bahwa MIF merupakan faktor yang terlibat pada anemia berat melalui supresi pertumbuhan progenitor granulosit-makrofag (*colony factor unit- granulocyte macrophage*/CFU-GM) (Martiney dkk., 2000). Namun studi oleh Awandare dkk (2007) menghasilkan dugaan bahwa MIF mungkin tidak bertanggung jawab dalam meningkatkan keparahan anemia pada anak-anak dengan malaria falsiparum akut.

Selain itu hubungan antara MIF, reseptor CD74 dan anemia pada malaria belum diketahui, karena itu perlu dilakukan studi tentang MIF dan CD74 dalam kaitannya dengan patogenesis anemia pada malaria.

Studi malaria pada manusia menunjukkan variasi kadar MIF dalam sirkulasi dan kerentanan terhadap anemia berat yang diinduksi malaria terkait variabilitas gen. Polimorfisme gen MIF menyebabkan perbedaan ekspresi MIF, pada satu studi dikatakan bahwa peningkatan ekspresi MIF berhubungan dengan peningkatan kerentanan terhadap penyakit, sebaliknya studi lain menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi MIF berhubungan dengan penurunan kerentanan terhadap SMA (Awandare, 2007; Risadi dan Rodriguez-Sosa, 2011). Penggunaan hewan coba perlu dilakukan untuk memahami peran MIF pada patologi maupun resistensi terhadap malaria. Karena penelitian MIF pada manusia dibatasi oleh variabilitas genetik (Awandare, 2007; Risadi dan Rodriguez-Sosa, 2011).

Persamaan yang signifikan antara manusia dan mencit, akan memberi analisis yang lebih dalam tentang mekanisme sitokin anti inflamasi dan pro inflamasi tanpa dibingungkan oleh variabilitas genetik pada manusia (Laminkara dkk., 2007).

Selain itu penggunaan hewan coba dalam penelitian malaria sangat perlu karena penelitian *in vitro* dan *in vivo* pada manusia tidak dapat menjelaskan dan menginterpretasi dengan lengkap sifat dasar dan perilaku sel-sel imun pada host. Mencit merupakan model yang tepat untuk meneliti faktor-faktor yang berkontribusi pada patologi anemia selama infeksi falsiparum akut (Laminkara dkk., 2007). *Plasmodium berghei*, *P. yoelii* dan *P. chabaudi* adalah parasit malaria pada mencit yang dapat digunakan untuk mengamati respon imun pada

infeksi malaria (Wykes dan Good, 2009; Miikura dkk., 2011). *P. berghei* dan *P. yoelii* telah digunakan secara rutin di laboratorium. *P. yoelii* telah digunakan secara luas untuk mempelajari aspek molekuler pada malaria (Doolan, 2000; Martin-Jaular, dkk., 2011). *P. yoelii* 17XL merupakan model infeksi malaria *falciparum* akut karena parasit tersebut dapat menginfeksi semua jenis eritrosit (Fahey dan Spitalny, 1984; Doolan, 2000). Penelitian menggunakan mencit yang diinfeksi *P. yoelii* 17XL diharapkan dapat digunakan untuk mengekstrapolasi infeksi malaria *falciparum* akut pada anak.

Limpa mempunyai tiga peran penting selama infeksi malaria. Peran limpa tersebut adalah melakukan destruksi dan pembuangan eritrosit yang terinfeksi parasit (*infected red blood cell*/iRBC) dari sirkulasi, sebagai tempat utama eritropoesis dan hematopoesis dan menghasilkan respon sel T dan sel B yang spesifik terhadap patogen pada pulpa putih. Limpa adalah tempat respon imun protektif dan patologis pada infeksi malaria berlangsung (Engwerda, Beattie, Amante, 2006). Karena itu untuk mempelajari sitokin-sitokin yang berperan dalam patogenesis anemia akibat malaria diperlukan pengamatan pada limpa dan sitokin-sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel imun dalam limpa.

Penelitian pada sitokin menyediakan informasi berharga tentang sifat alamiah terhadap respons imun host. Regulasi ekspresi sitokin terpenting berada level transkripsi, *message turnover* dan degradasi protein, karena itu untuk mempelajari aspek molekuler dengan baik perlu dilakukan studi terhadap ekspresi *messenger Ribo Nucleic Acid* (mRNA) sitokin. MIF adalah sitokin yang disimpan dalam bentuk setengah jadi (*preformed*) dalam vakuola makrofag, sedangkan CD74 merupakan suatu protein transmembran, sehingga penelitian yang

mempelajari tentang aspek molekular MIF dan CD74 paling tepat dilakukan dengan mengamati ekspresi mRNA MIF dan CD74 karena dapat mengetahui produksi sitokin langsung dari sumbernya. *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) digunakan untuk mempelajari mekanisme yang mendasari ekspresi gen karena sensitif dan kuat untuk kuantifikasi mRNA, dan memerlukan sedikit sampel dibanding teknik sebelumnya, seperti *Northern blot*, *dot blot* dan *hybridization protection assays* dan *in situ hybridization* (Freeman, Walker dan Vrana, 1999). Metode RT-PCR terkini untuk meminimalkan eror dan mengoreksi variasi sampel adalah dengan cara mengamplifikasi sampel bersama dengan gen target secara simultan. Gen target merupakan suatu gen yang menyediakan referensi internal untuk menormalisasi nilai RNA target. Beta – actin (β -actin) merupakan salah satu gen yang dapat digunakan sebagai RNA referensi ini, selain itu β -actin banyak digunakan sebagai kontrol internal dalam RT-PCR (Jensen, 2012).

Adanya berbagai variasi data mengenai peran MIF dalam patogenesis anemia malaria, khususnya berkaitan dengan SMA, menunjukkan bahwa peran MIF masih belum jelas dalam malaria. Hingga saat ini peran CD74 sebagai reseptor MIF belum dipelajari dalam patogenesis malaria, khususnya anemia malaria, oleh karena itu studi mengenai peran MIF dan CD74 dalam patogenesis anemia dengan hewan coba penting untuk dilakukan. Penelitian ini akan menganalisis ekspresi mRNA MIF dan CD74 dalam kaitannya dengan patogenesis anemia pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana ekspresi mRNA MIF dan CD74 dalam kaitannya dengan patogenesis anemia pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

Menganalisis ekspresi mRNA MIF dan CD74 dalam kaitannya dengan patogenesis anemia pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL

Tujuan khusus :

1. Mengidentifikasi ekspresi mRNA MIF dan CD74 pada limpa mencit strain strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL
2. Mengidentifikasi ekspresi mRNA TNF α , IFN γ , IL-10 dan GM-CSF pada limpa mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL
3. Mengukur berat badan, kadar hemoglobin (Hb) dan parasitemia pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL
4. Mengamati perubahan ukuran, warna dan perubahan mikroarsitektur pada limpa mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL
5. Menganalisis ekspresi mRNA MIF dan CD74 dan kaitannya dengan anemia yang terjadi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat akademik :

1. Memberi sumbangan pengetahuan dalam menentukan peran MIF pada patogenesis anemia pada malaria
2. Memberi sumbangan pengetahuan dalam memahami dasar regulasi sistem imun pro inflamasi

Manfaat praktis :

Menjadi dasar sebagai penanda biologis pada anemia pada malaria