

DISERTASI

**PERAN TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)
DAN FAKTOR PENGHAMBAT PRODUKSI TNF
PADA GEJALA KLINIK
MALARIA FALCIPARUM DAN MALARIA VIVAX
DI DAERAH HIPOENDEMIK LOMBOK**



KK

Dik R 51/02

Sau

P -

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

SRI HIDAJATI BAJU SANTOSO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**PERAN TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)
DAN FAKTOR PENGHAMBAT PRODUKSI TNF
PADA GEJALA KLINIK
MALARIA FALCIPARUM DAN MALARIA VIVAX
DI DAERAH HIPOENDEMIK LOMBOK.**

DISERTASI

**Untuk memperoleh gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**dan telah dipertahankan di hadapan
Dewan Ujian Doktor Terbuka
pada hari : Kamis
tanggal : 23 Nopember 2000
pukul : 10.00**

Oleh

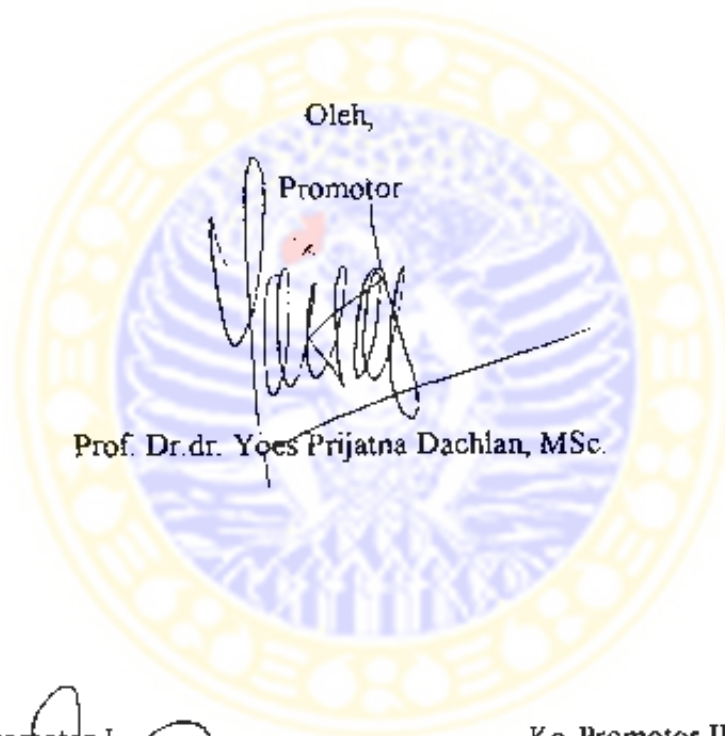
SRI HIDAJATI BAJU SANTOSO

NIM 0992112390

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

1 Maret 2001



Oleh,

Promotor

Prof. Dr.dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc.

Ko-Promotor I

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end. A diagonal line is drawn across the signature from the bottom left to the top right.

Dr. Wynand M. C. Eling

Ko-Promotor II

A handwritten signature in black ink, featuring a large, oval-shaped loop on the left and several smaller, vertical strokes on the right.

Prof. Dr.dr. Suwignjo Soemohardjo

Telah diuji pada ujian tahap 1
Tanggal 28 September 2000

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Rachmat Santoso, dr., DSPA.

Anggota : 1. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc.

2. Dr. Wijnand M. C. Eling

3. Prof. Dr. Suwignyo Soemohardjo, dr., SpPD.,K.

4. Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr.

5. Prof. Eddy Suwandoyo, dr. SpPD, KKTJ

6. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH.

7. Dr. Sri Subekti B.S., drh.

8. Prof. Subaktiningsih, dr., MS.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
No 7998/JQ3/PP/2000
Tanggal 12 Oktober 2000

UCAPAN TERIMA KASIH

Rasa syukur dan segala puji saya panjatkan kehadirat Gusti Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang, yang telah memberi limpahan rahmat, serta hidayah dan pertolongan – Nya, sehingga saya memperoleh kesempatan mengikuti pendidikan doktor, menjalaninya dengan penuh liku, dan akhirnya dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga disertasi ini, serta pengalaman dan pengetahuan yang saya peroleh dalam menyelesaikannya, dapat meningkatkan pengabdian saya dan membawa masalahat.

Kemudian, ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada :

Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc. atas kesediaannya sebagai Promotor, dan selaku Kepala Laboratorium Parasitologi FK dan Ketua TDC Universitas Airlangga, telah memberikan bimbingan dan pengarahan, serta memberikan fasilitas-fasilitas dalam perjalanan dan penyelesaian pendidikan, penelitian dan penulisan serta perbaikan disertasi ini.

Prof. H.R. Rachmat Santoso, dr., SpPA., yang telah bersedia menjadi Promotor pada awal pendidikan saya, dan telah memberikan bimbingan dan pengarahan bagi terselenggaranya pendidikan sampai penulisan disertasi ini.

Prof. Dr. Suwignjo Soemohardjo, dr., Sp.PD., yang telah bersedia menjadi Ko-promotor, dan telah amat membantu dalam penelitian dan pengumpulan sampel di Lombok, sampai dengan penulisan disertasi ini.

Dr. Wijnand M. C. Eling, yang telah bersedia menjadi Ko-promotor, dan telah membimbing dengan sabar dan penuh perhatian, serta benar-benar membantu dalam penyelesaian penelitian di Nijmegen sampai dengan penulisan dan perbaikan disertasi ini.

Prof. H. Soedarto, dr., DTMH., Ph.D., Rektor Universitas Airlangga dan mantan Kepala Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, serta Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr., mantan Rektor Universitas Airlangga, yang telah memberi ijin saya mengikuti pendidikan Doktor.

Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr.,Sp.P,K., Direktur Program Pasca Sarjana, Prof. Dr. Soedijono Tirtowidarjo, dr., Sp.THT,K., mantan Direktur Program Pasca Sarjana dan Prof. Dr. Soetarjadi, Apt. mantan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, yang telah menerima saya sebagai mahasiswa Program Doktor.

Prof. Dr. H. M.S. Wiyadi, dr.,Sp.THT,K., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin untuk mengikuti pendidikan Program Doktor serta memberikan fasilitas-fasilitas guna melaksanakan penelitian dan konsultasi.

Prof. Dr. H. Askandar Tjokroprawiro, dr.,Sp.PD,K., mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, almarhum Prof. R.Soemarto, dr.,Sp.PD,K., mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan ijin untuk mengikuti pendidikan Program Doktor serta memberikan fasilitas-fasilitas guna melaksanakan penelitian dan konsultasi.

Prof. Dr. H. IG. N. Gde Ranuh dr. Sp.A.K, mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dan pada waktu itu sebagai Ketua TDRK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan fasilitas-fasilitas dalam pelaksanaan research-training dan penelitian.

Sdr. H. Kuntoro, dr., MPH, Dr.PH, yang telah bersedia menjadi konsultan dan telah memberi dorongan dan bimbingan untuk menulis dan menyelesaikan serta memperbaiki disertasi ini, dan telah membantu dalam analisa statistik data-data penelitian.

Prof. Dr. H.M. Zainuddin, Apt.,MS., yang telah mengajarkan metodologi penelitian dan statistik pada waktu saya menjadi mahasiswa, dan selanjutnya menjadi konsultan dan sangat membantu dalam penyusunan dan perbaikan penulisan disertasi ini.

Prof. Hiroji Kanbara, M.D., Ph.D. dari Universitas Nagasaki, yang telah membimbing saya dalam metode pembiakan parasit malaria dan teknologi laboratorium yang lain, dan membantu dalam pengumpulan sampel dan pemeriksaan laboratorium serta memberikan bimbingan ilmiah Begitu juga kepada Dr. Nakazawa.

Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr. atas petunjuk-petunjuk ilmiahnya dalam penelitian, penulisan dan perbaikan disertasi ini.

Prof. H. Eddy Soewandojo, dr., Sp.PD., KTI, atas petunjuk-petunjuknya yang sangat berharga dalam penulisan dan perbaikan disertasi ini.

Prof. Eddy Pranowo Soedibjo, dr., MPH., atas petunjuk-petunjuknya yang sangat berharga dalam penulisan dan perbaikan disertasi ini.

Dr. Sri Subekti Bendryman, drh, yang telah memberi dukungan moral dan membantu mengoreksi naskah dengan telaten.

Prof. Subaktiningsih, dr, MSc, atas petunjuk-petunjuknya perbaikan disertasi ini.

Prof. Dr.H. Pitono Soeparto, dr., Sp.AK., sebagai Ketua Panitia Penguji Ujian Terbuka, serta para anggota Panitia Penguji yang belum tersebut di atas : Prof. Dr. H. Umar Kasan, dr., Dr. Suhartono Taat Putra, dr.,MS., Prof.Dr.Hj. Moetmainah Prajitno, drg., Dr.H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., dan Dr. L. Dyson., M.A., saya sampaikan terimakasih atas saran-sarannya yang berharga untuk perbaikan disertasi ini.

Para pengajar Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga maupun para Penanggung Jawab Mata Kuliah dari Universitas Indonesia (Prof.Dr.H.Kamen Baratawidjaja,dr., SpPD, KAI, FAAAAI) dan Universitas Gajah Mada (Prof. Soesanto Tjokrosonto,dr.,M.Comm H.M.Sc., DTM&H., Ph.D.), yang telah membuka cakrawala ilmu bagi mahasiswanya.

Direktur RSUD Mataram, Kepala Bagian Penyakit Dalam dan Kepala Unit Riset Biomedik RSUD Mataram, yang telah memberi ijin untuk melakukan penelitian di RSUD Mataram.

Kepala Kantor Wilayah Departemen Kesehatan Nusa Tenggara Barat, yang telah memberikan ijin melakukan penelitian di Lombok dan Sumbawa. Demikian juga kepada Dokter Agus Sutanto, Kepala Desban PPKP Kantor Wilayah Departemen Kesehatan Nusa Tenggara Barat.

dr. Wenny Astuti Aswan dari RSUD Mataram, yang kini telah mencapai gelar Magisternya, yang dengan telaten telah banyak sekali membantu dalam pengumpulan dan seleksi pasien serta penyelenggaraan pengumpulan sampel di RSUD Mataram dan

beberapa Puskesmas di sekitar Mataram. Tanpa bantuan “bekas murid saya” yang kemudian menjadi sahabat saya ini, penelitian ini tidak akan terlaksana dengan baik. Semoga budi baik anda mendapat balasan dari Yang Maha Kuasa

Saudari Nengah analis dari RSUD Mataram, saudari Sri Suhartini dan kawan-kawannya dari Unit Riset Biomedik RSUD Mataram, para analis di Laboratorium Hepatika Mataram, yang telah membantu dalam pengumpulan sampel di RSUD dan Puskesmas Gangga dan Tanjung, serta pengerjaan sampel di Mataram sebelum dibawa ke Surabaya. Begitu juga sdr. Djoko Dipojono dan ibu Siti Samsiah yang telah membantu pengumpulan sampel di Kecamatan Utan-Rhee, Kabupaten Sumbawa Barat.

Para dokter dan perawat di Ruang Penyakit Dalam RSUD Mataram yang telah membantu seleksi dan pengumpulan sampel dan follow up penderita.

dr Gunawan Effendy dan dokter-dokter Puskesmas Gangga dan Tanjung, Lombok Barat, atas bantuannya dalam seleksi penderita dan pengumpulan sampel di kedua Puskesmas tersebut. Juga petugas laboratorium Puskesmas Gangga dan Tanjung, yang telah membantu seleksi penderita dan menemani home visit ke rumah penderita di pelosok Kecamatan Gangga dan Tanjung untuk follow up.

Saudari Herlina, Saudari Fitriah dan saudari Umi Hidayah, SKM., yang dengan penuh tanggung jawab membantu pekerjaan-pekerjaan laboratorium di lab. Malaria TDC maupun di Laboratorium Parasitologi FK Unair, serta membantu komputasi data. Begitu juga para karyawan Laboratorium Parasitologi yang lain. Juga para teknisi dan laboran lain di TDC.

Ir. Sunarnatalina Melaniani, MKes, yang telah membantu komputasi data dan penghitungan statistik, serta mengajarkan cara-cara menggunakan SPSS.

Prof. R. van Furth, Dr. Henry Beekhuizen, Dr. Peter H. Nibbering, Dr. Jan Langermans dan Dr. Stephen Vreden dari Afdeling Infektie Ziekte, Academisch Ziekenhuis, Leiden, atas bimbingan dan bantuannya dalam melakukan penelitian di bagian tersebut. Begitu juga kepada saudari Joke van der Gevel, Kitty Kwappenberg, Thedel van Zwet, Anja dan Thimo yang telah mengajari dan membantu saya dalam teknik-teknik isolasi, kultur dan stimulasi monosit, ELISA untuk berbagai sitokin dan sebagainya.

Kepala Bagian Microbiologie serta Dr. Robert Sauerwein selaku Kepala Subbagian Parasitologie Academisch Ziekenhuis, Nijmegen, atas ijin dan bantuannya dalam melakukan penelitian laboratorium di bagian tersebut.

Saudara Dr. CC. Hermsen, Karina Teelen, Marga dan Marianne, yang telah membantu dalam penelitian dan teknik kultur monosit dan sebagainya, di Laboratorium Parasitologie AZN.

Dr. Petra van Langevelde (dan Gerbert) yang telah membantu dan menemani saya dalam suka dan duka selama penelitian di Leiden dan Nijmegen.

Prof. Kazuyuki Tanabe, DSc., DMSc., dari Osaka Institute of Technology dan Shoji Uga, Ph.D., dari Universitas Kobe, yang telah melatih dasar-dasar pekerjaan laboratorium dan ELISA serta pembuatan “crude antigen”.

Bapak Budi Leksana dari Laboratorium NAMRU Jakarta, yang telah memberi petunjuk dalam teknik kultivasi *Plasmodium falciparum* yang sesuai, sehingga sistim

ini digunakan sampai sekarang di laboratorium kami. Salah satu galur parasit yang diberikannya, saya gunakan sebagai antigen.

Rekan-rekan Staf Pengajar Laboratorium Parasitologi FK Unair yang telah bekerjasama dengan baik, dan terutama dr. Kusmartisnawati Nafir, MS., drh. Suhintam Pusarawati, MS., dr. Indah Tantular, MS., yang telah membantu dalam penelitian lapangan dan laboratorium serta penyediaan keperluan disertasi.

Para Pengelola dan Pelaksana TDC, yang telah memberi bantuan moril dan kerjasama yang baik selama ini.

Rasa terima kasih dan penghargaan khusus saya tujukan kepada para penderita malaria yang telah bersedia menjadi subyek penelitian, diantaranya Bapak WS sekeluarga yang bertempat tinggal di belakang Polindes Sokong. Tanpa bantuan dan kesediaan saudara-saudara, tidak mungkin saya menyelesaikan disertasi ini. Semoga pengorbanan saudara-saudara tidak sia-sia.

Ayah saya almarhum R. Sastrohoetomo dan Ibu saya almarhumah R Ngt Oemi Mustikah, yang telah membesarkan dan mengasuh saya dengan penuh kasih sayang dan kesabaran dalam kesederhanaan dan taqwa, semoga Bapak Ibu mendapat rahmat di sisi Gusti Allah swt. Saya selalu ingat pesan Ibu, agar kami meskipun perempuan, tetap meningkatkan pendidikan dan pengetahuan untuk bekal hidup di dunia dan akherat.

Ayah dan Ibu mertua R. Soeprajitno yang memberi contoh untuk *auto-didact* dan rajin bekerja, saya sampaikan terimakasih atas dukungannya selama saya menjalani masa pendidikan yang panjang.

Saudara-saudara saya, mbak Umi Kibtiyah Soepanto almarhum, mbak Siti Ruwiyah Soenarso, mas Didiek Sastrohoetomo, mas Dr.Ir. Ali Sastrohoetomo, mbak Srihadi Kustinah Soeharso, mbak Dra. Kun Sri Hartinah Soekoyoewono almarhum, dik Ir. Sri Amiranti Erwin Sudarma, beserta para ipar, yang selalu saling menolong, dan telah membantu saya menyelesaikan studi sarjana dan seterusnya, saya sampaikan terima kasih dan hormat saya.

Dokter Bayu Santoso, suami saya yang saya cintai dan saya hormati, yang telah memberi kesempatan, dorongan dan pengertian untuk memulai, kemudian menjalani pendidikan dan menyelesaikan program doktor ini. Tanpa ijin dan toleransinya, semuanya tidak akan terlaksana. Demikian juga anak-anak saya tersayang Titut Retno Utami, Niken Asri Utami dan Tunjung Tri Utomo, terima kasih atas bantuan dan pengertian kalian. Selain rasa terima kasih, ibu juga minta maaf bahwa ibu telah memanfaatkan sebagian besar waktu menjelang ujian-ujian akhir untuk menyelesaikan disertasi. Semoga ada gunanya bagi kalian juga.

RINGKASAN

Malaria merupakan penyakit tropis yang penting, yang tersebar luas di 90 negara. Setiap tahun 300 sampai 500 juta orang menderita sakit malaria, di antaranya dapat menjadi berat, dan 1,5 sampai 2,7 juta diantaranya meninggal dunia. Akhir-akhir ini, malaria kembali menjadi ancaman tidak saja bagi penduduk daerah endemik, tetapi juga bagi penduduk daerah non endemik. Majunya transportasi dan meningkatnya mobilitas penduduk justru meningkatkan penyebaran kasus dan kasus resisten obat.

Di Indonesia sendiri, 93,5 juta penduduk merupakan *population at risk*. Penyakit ini kini tidak hanya menjadi masalah kesehatan utama di Luar Jawa dan Bali, tetapi sudah meluas ke seluruh Indonesia. Situasi yang tidak stabil dan terjadinya perpindahan penduduk dari daerah endemik ke daerah non endemik dan sebaliknya, meningkatkan kasus dan memperluas penyebaran.

Lombok, sebagai daerah yang dinyatakan daerah hipo-mesoendemik, juga menunjukkan peningkatan insidens, dan kasus KLB (kejadian luar biasa) semakin sering terjadi. Sebagai daerah hipo-mesoendemik, malaria dapat menunjukkan bentuk tersendiri baik dalam sifat penyakit maupun respon imun. Kekhususan ini mengundang pertanyaan untuk diteliti.

Plasmodium, parasit penyebab malaria, mempunyai daur hidup yang sangat kompleks dengan melewati perubahan-perubahan bentuk dan habitat. Hal ini memberikan masalah tersendiri dalam mempelajari patofisiologinya. Adanya berbagai spesies dan galur, besarnya diversitas gen dan banyaknya variasi antigen juga

menyebabkan problema yang rumit, baik dalam diagnosis, pengobatan dan pembuatan vaksin. Secara alami, imunitas hanya dapat diperoleh dengan pemaparan berulang-ulang dan kontinu. Penduduk dewasa yang tinggal di daerah endemik sejak kecil, tidak lagi menunjukkan gejala penyakit meskipun masih mengandung parasit. Dengan memperhatikan adanya tahap *anti-disease immunity* ini, Playfair dan kawan-kawan dari London mempunyai ide untuk pembuatan *anti-disease vaccine*, sebagai alternatif terhadap *anti-parasite vaccine* yang setelah menjalani riset bertahun-tahun tidak kunjung ditemukan. Tetapi untuk menuju ke sana, masih banyak yang perlu dipelajari. Bagaimana terjadinya "*disease*" pada malaria, penting untuk diketahui sebelum orang membuat *anti-disease vaccine*.

Dalam mempelajari patofisiologi malaria, para peneliti menemukan sebuah mediator yang dianggap mempunyai peran sentral dalam terjadinya gejala klinik. Tumor Necrosis Factor (TNF) merupakan sitokin yang mayoritas diproduksi oleh makrofag, dianggap dapat memperantarai timbulnya demam, anemia, gangguan fungsi hati, gangguan fungsi ginjal, edema paru (ARDS – *adult respiratory distress syndrome*), penurunan tensi sampai syok, serta malaria serebral.

Penelitian ini bertujuan meneliti peran TNF tersebut pada penderita-penderita malaria di daerah hipo-mesoendemik seperti Lombok, serta menelusuri timbulnya suatu respon yang dapat menghambat produksi TNF tersebut dengan pengukuran kapasitas daya hambat faktor tersebut dalam suatu sistim biologik *in vitro*. Penelitian peran TNF dalam timbulnya gejala klinik malaria dilakukan dengan menghubungkan kadarnya di dalam serum dengan derajat parasitemia dan tingginya parameter-parameter gejala klinik dari malaria. Adanya respon imun yang menghambat produksi

TNF diharapkan berkorelasi dengan penurunan parameter-parameter tersebut. Dalam analisis, juga dilakukan perbandingan antara penderita-penderita infeksi *P. falciparum* dan *P. vivax*, karena terdapat perbedaan fisiologi pada kedua spesies, yaitu adanya sekuestrasi pada *P. falciparum* yang tidak terdapat pada *P. vivax*.

Hasil analisis ternyata menunjukkan bahwa pada penderita-penderita malaria di Lombok ditemukan kadar TNF yang cukup tinggi, yaitu antara 0 dan 3057 pg/ml dengan rata-rata 256,72 pg/ml, yang diperkirakan sejalan dengan respon penderita dengan tingkat imunitas rendah di daerah hipoendemik. Kadar TNF ini ternyata lebih tinggi secara bermakna pada penderita malaria *falciparum* dari pada penderita malaria *vivax*, dan juga lebih tinggi pada penderita malaria berat dari pada penderita malaria ringan. Tidak ditemukan korelasi antara tingginya kadar TNF dengan derajat parasitemia. Pada penderita malaria *falciparum*, tidak ditemukan korelasi antara kadar TNF dengan masing-masing komponen gejala klinik, tetapi pada malaria *vivax* ditemukan korelasi bermakna antara kadar TNF dengan gangguan fungsi hati dan secara umum terlihat koefisien korelasi yang lebih besar dengan gejala klinik dari pada malaria *falciparum*.

Pada penderita-penderita malaria tersebut ternyata juga dapat ditemukan aktivitas yang dapat menghambat produksi TNF pada biakan monosit *in vitro*. Pengamatan kurva tingginya daya hambat produksi TNF tersebut, yang menurun dan kemudian menghilang pada minggu ketujuh, menunjukkan kemiripan dengan kurva *blocking antibody* IgM yang ditemukan Playfair dan kawan-kawan (Bate, *et al.*, 1989), serta sesuai dengan situasi daerah hipo-mesoendemik di mana kejadian re-infeksi atau re-inokulasi kecil.

Besarnya daya hambat produksi TNF tersebut tidak berkorelasi dengan penurunan kadar TNF maupun penurunan parameter-parameter gejala klinik pada penderita-penderita *P. falciparum*, tetapi pada penderita-penderita *P. vivax* menunjukkan korelasi sangat bermakna dengan penurunan kadar TNF dan menunjukkan korelasi (meskipun tidak bermakna) dengan penurunan hampir semua gejala klinik.

Perbedaan di antara penderita-penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* tersebut mungkin dapat dihubungkan dengan adanya proses sekuestrasi sel darah merah terinfeksi dalam organ-organ yang terjadi pada *P. falciparum* dan tidak terjadi pada *P. vivax*. Sekuestrasi yang terjadi pada *P. falciparum* ini dapat berakibat akumulasi dari produksi TNF dalam organ-organ yang terlibat sehingga kadar TNF yang beredar dalam sirkulasi tidak mencerminkan kadarnya di dalam organ yang mengalami gangguan fungsi. Sekuestrasi juga dapat berakibat *pooling* faktor penghambat produksi TNF dalam organ tersebut.

Selanjutnya, dalam penelitian ini juga diketahui bahwa terdapat korelasi besarnya daya hambat terhadap stimulasi produksi TNF *in vitro* oleh dua macam antigen yang berasal dari dua daerah berbeda. Adanya reaksi silang ini diharapkan dapat dimanfaatkan dalam pengembangan pembuatan *anti-disease vaccine* untuk Indonesia yang terdiri dari pulau-pulau dengan berbagai galur *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

Malaria is an important tropical disease that kills many people and causes severe disease. The disease severity varies with different levels of endemicity and among different immune status of the population.

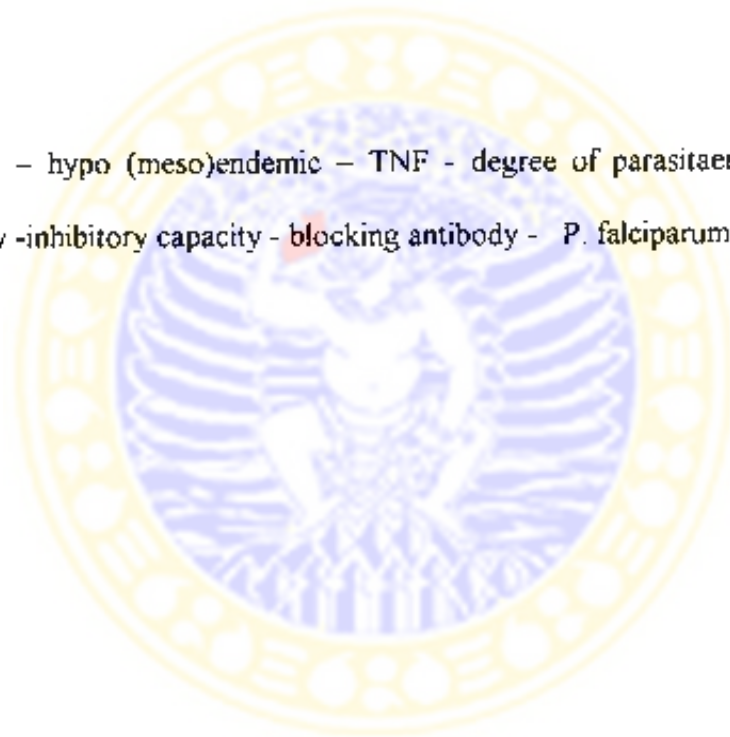
Indonesia consists of many islands with different levels of malaria endemicity. Lombok, a developing economic and tourist area located in West Nusa Tenggara, was identified as a hypo-mesoendemic area, has now increasing tendency of malaria incidence. This study was conducted there to define the role of Tumor Necrosis Factor (TNF), a mediator which was presumed to play role in pathogenesis of malaria, and to correlate its concentrations with parasitaemia and disease severity. A further effort was also performed to assess the inhibitory capacity of malaria patient's sera on TNF production capacity of monocyte culture upon stimulation with malaria antigen, and to correlate the inhibitory capacity with the decrease of patient's serum TNF levels and disease severity.

The study showed that malaria patients had high levels of TNF (between 0 and 3057 pg ml⁻¹, average of 256.72 pg ml⁻¹), which was presumed to be associated with the lower immune status of the people. TNF concentrations were higher in falciparum patients than vivax patients, and also higher in severe patients than in the mild ones. No correlations was found between TNF levels and organ dysfunctions in falciparum malaria, but higher (although not significant) correlation coefficient was confirmed in vivax malaria. Patient's sera also showed inhibitory activities on malaria-antigen stimulated TNF production in monocytes, which mostly disappeared during

convalescence. The inhibitory capacity did not correlate with the decrease of TNF levels and disease severity in falciparum malaria, but it showed higher correlation coefficients in vivax malaria. It was presumed that the differences were related to sequestration of schizont infected-red blood cells in falciparum malaria, that resulted in different levels of TNF and blocking antibody between the affected organs and systemic circulation.

Key words :

malaria – hypo (meso)endemic – TNF - degree of parasitaemia - disease severity -inhibitory capacity - blocking antibody - P. falciparum - P. vivax.



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	v
ABSTRACT	ix
Daftar Isi	xi
Daftar Tabel	xvii
Daftar Gambar	xx
Daftar Lampiran	xxii
Daftar Singkatan	xxiii
Bab 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	10
1.3 Tujuan Penelitian	11
1.4 Manfaat Penelitian	13
Bab 2 TINJAUAN PUSTAKA	15
2.1 Parasit Penyebab Malaria dan Daur Hidupnya	15
2.2 Gejala Klinik Malaria	21
2.3 Patologi dan Patofisiologi Malaria	26
2.3.1 Sitokin dan penyakit	27
2.3.2 Riwayat penelusuran peran TNF pada malaria	27
2.3.3 Efek Tumor Necrosis Factor secara umum	29
2.3.4 Data klinis mengenai kenaikan kadar TNF dan sitokin lain pada penderita malaria	31
2.4 Peran TNF dalam Patogenesis Malaria	33
2.4.1 Demam	33
2.4.2 Anemia	36
2.4.3 Hemoglobinuria dan blackwater fever	39
2.4.4 Malaria serebral	40

2.4.5	Gangguan fungsi hati dan icterus	50
2.4.6	ARDS	51
2.4.7	Kelainan hemostatik dan trombositopenia	52
2.4.8	Gangguan fungsi ginjal	54
2.4.9	Gangguan kardiovaskuler dan syok	55
2.4.10	Hipoglikemia dan acidosis laktat	56
2.5	Stimulasi dan Hambatan Produksi TNF pada Malaria	57
2.5.1	Stimulasi produksi TNF pada monosit oleh antigen parasit malaria	57
2.5.2	Korelasi antara kemampuan antigen menstimulir produksi TNF dan gejala klinik	59
2.5.3	Analisis komponen antigen yang menstimulir TNF serta antibodi yang mem-blok-nya	60
2.5.4	<i>Coupling</i> fosfolipid dengan protein karier menghasilkan antibodi IgG yang dapat bertahan lebih lama	62
Bab 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	64
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	64
3.2	Hipotesis Penelitian	72
Bab 4	METODE PENELITIAN	74
4.1	Rancangan Penelitian	74
4.2	Bagan Alur Penelitian	75
4.3	Populasi dan Sampel Penelitian	75
4.3.1	Populasi penelitian	75
4.3.2	Jumlah sampel	75
4.4	Variabel dan Parameter yang Diteliti	76
4.4.1	Variabel-variabel dalam penelitian	76
4.4.2	Definisi operasional variabel	76
4.5	Tempat dan Waktu Penelitian	79
4.6	Alur Penelitian	80
4.6.1	Tahap persiapan	84

4.6.2 Tahap pelaksanaan	84
4.6.3 Pengolahan sampel di laboratorium	86
4.7 Analisis Data	89
Bab 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	90
5.1 Pelaksanaan Pengumpulan Sampel dan Pemanfaatannya.	90
5.2 Hasil Penelitian Bagian Pertama	91
5.2.1 Distribusi penderita malaria sesuai dengan spesies parasit penyebab dan derajat parasitemia	91
5.2.2 Gejala klinik penderita malaria	94
5.2.3 Hasil pengukuran kadar TNF pada penderita dan fluktuasinya	98
5.3 Analisis Hasil Penelitian Bagian Pertama	100
5.3.1 Perbandingan kadar TNF pada penderita malaria <i>falciparum</i> dan malaria vivax	100
5.3.2 Perbandingan kadar TNF pada penderita malaria berat dan ringan	100
5.3.3 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik	101
5.3.4 Korelasi antara kadar TNF dengan derajat parasitemia	104
5.3.5 Korelasi antara kadar TNF dengan beratnya gejala klinik	104
5.3.6 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada malaria ringan dan malaria berat	105
5.4 Hasil Penelitian Bagian Kedua	107
5.4.1 Jumlah sampel yang dapat diukur daya hambatnya	107
5.4.2 Hasil pengukuran daya hambat serum penderita dan kurva waktunya	107
5.5 Analisis Hasil Pengukuran Daya Hambat Produksi TNF pada Serum Penderita Malaria	110
5.5.1 Analisis perbedaan harga rata-rata daya hambat serum penderita dan korelasi hasil pengukuran daya hambat terhadap stimulasi kedua macam antigen yang dipakai	110

5.5.2	Fluktuasi harga rat-rata daya hambat serum penderita pada L-5	110
5.5.3	Perbandingan daya hambat serum penderita <i>P.falciparum</i> dan <i>P.vivax</i>	112
5.5.4	Korelasi antara daya hambat produksi TNF dalam serum penderita dengan kadar TNF	113
5.5.5	Analisis korelasi antara daya hambat serum penderita dengan gejala klinik malaria	113
Bab 6 PEMBAHASAN		116
6.1	Pelaksanaan Penelitian dan Permasalahannya.	116
6.2	Pembahasan Hasil Penelitian Bagian Pertama	120
6.2.1	Distribusi malaria berdasarkan spesies parasit penyebabnya.	120
6.2.2	Gejala klinik malaria dan korelasinya dengan parasit penyebab.	122
6.2.2.1	Hubungan malaria berat dengan spesies parasit.	122
6.2.2.2	Beberapa macam gejala/gangguan fungsi organ dapat ditemukan pada satu penderita.	123
6.2.2.3	Korelasi gejala klinik dengan derajat parasitemia.	124
6.2.3	Analisis Kadar TNF	125
6.2.3.1	Hasil pengukuran kadar TNF dalam serum penderita dan fluktuasinya.	125
6.2.3.2	Perbandingan dengan hasil pengukuran kadar TNF pada penderita malaria di daerah lain	126
6.2.3.3	Korelasi antara kadar TNF dengan spesies parasit penyebab	129
6.2.3.4	Korelasi antara kadar TNF dengan tingginya parasitemia	130

6.2.3.5	Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik malaria.	132
6.2.3.5.1	Perbandingan kadar TNF pada penderita malaria berat dan malaria ringan	132
6.2.3.5.2	Korelasi antara kadar TNF dan gejala klinik	132
6.2.3.5.3	Mengapa tidak ditemukan korelasi antara kadar TNF dan gejala klinik pada <i>P. falciparum</i> ?	133
6.2.3.6.1	Sekuestrasi pada infeksi <i>P. falciparum</i> dapat menyebabkan akumulasi TNF di dalam organ	137
6.2.3.6.2	Anemia dan efek sekuestrasi	139
6.2.3.6.3	Demam, TNF dan parasit malaria	141
6.2.3.6.4	Gangguan fungsi hati pada malaria	143
6.3	Pembahasan Penelitian Bagian Kedua	145
6.3.1.1	Korelasi daya hambat produksi TNF pada stimulasi antigen yang berbeda.	145
6.3.1.2	Perbandingan daya hambat produksi TNF serum penderita dari RSU dan Puskesmas	146
6.3.1.3	Kurva daya hambat produksi TNF dalam serum penderita	146
6.3.1.4	Perbandingan daya hambat produksi TNF dari serum penderita <i>P. falciparum</i> dan <i>P. vivax</i>	148
6.3.2	Analisis hubungan antara daya hambat serum penderita yang diukur secara <i>in vitro</i> dengan gejala klinik malaria	149
6.3.2.1	Perbandingan daya hambat produksi TNF pada penderita malaria berat dan malaria ringan	149
6.3.2.2	Korelasi antara besarnya daya hambat serum dengan kadar TNF dalam serum	150

6.3.2.3 Korelasi daya hambat yang diukur secara in vitro dengan parameter gejala klinik	150
6.4.1 Keberhasilan uji hipotesis	152
Bab 7 KESIMPULAN DAN SARAN	157
Kesimpulan	157
Saran	158
DAFTAR PUSTAKA	161
LAMPIRAN	184



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Severe manifestations and complications of falciparum malaria	24
Tabel 4.1. Kriteria gejala dan harga laboratorium dalam hubungan dengan beratnya gejala klinik malaria	78
Tabel 5.1 Jumlah sampel yang dapat dikumpulkan dari masing-masing penderita malaria di RSUD Mataram dan Puskesmas Tanjung dan Gangga	91
Tabel 5.2 Distribusi penderita malaria di RSUD Mataram berdasarkan jenis parasit penyebab, derajat parasitemia dan berat-ringannya penyakit	92
Tabel 5.3 Distribusi penderita malaria dari Puskesmas Gangga dan Tanjung dan sekitarnya berdasarkan jenis parasit penyebab dan derajat parasitemia	93
Tabel 5.4 Hasil pengukuran laboratorium klinik pada <i>P. falciparum</i> (1), <i>P. vivax</i> (2) dan infeksi campuran (3)	95
Tabel 5.5 Frekuensi masing-masing gejala klinik pada 52 penderita malaria di RSUD Mataram	96
Tabel 5.6 Distribusi penderita menurut banyaknya organ/sistim yang terganggu pada penderita malaria di RSUD Mataram	97
Tabel 5.7 Kadar TNF rata-rata dalam serum penderita RSUD Mataram pada sampel-sampel pengambilan pertama, kedua dan ketiga (<i>follow up</i>)	99
Tabel 5.8 Kadar rata-rata TNF pada sampel-sampel serum penderita malaria <i>falciparum</i> , malaria <i>vivax</i> dan infeksi campuran	100
Tabel 5.9 Kadar TNF rata-rata pada sampel-sampel serum penderita malaria berat dan malaria ringan	101
Tabel 5.10 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada seluruh penderita malaria RSUD Mataram (malaria <i>falciparum</i> dan malaria <i>vivax</i>)	101

Tabel 5.11 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada penderita malaria <i>falciparum</i>	102
Tabel 5.12 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada penderita malaria <i>vivax</i>	103
Tabel 5.13 Korelasi antara kadar TNF dalam serum dan derajat parasitemia penderita malaria <i>falciparum</i> , malaria <i>vivax</i> , dan infeksi campuran	103
Tabel 5.14 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada penderita malaria <i>falciparum</i> di RSUD Mataram	104
Tabel 5.15 Korelasi antara kadar TNF dalam serum dengan gejala klinik pada penderita malaria <i>vivax</i> di RSUD Mataram	105
Tabel 5.16 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada malaria <i>falciparum</i> dengan pemilahan penderita malaria ringan dan malaria berat	106
Tabel 5.17 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada malaria <i>vivax</i> dengan pemilahan penderita malaria ringan dan malaria berat	106
Tabel 5.18 Jumlah sampel yang dapat diukur daya hambat serumnya	107
Tabel 5.19 Hasil pengukuran daya hambat serum penderita terhadap produksi TNF secara <i>in vitro</i> disertai hari pengambilan sampel dan species parasit yang ditemukan dalam sediaan hapusan	108
Tabel 5.20 Perbandingan harga rata-rata daya hambat produksi TNF dari serum penderita terhadap stimulasi antigen Lo-2 dan G-2300	110
Tabel 5.21 Harga rata-rata daya hambat pada serum penderita RSUD Mataram untuk sampel-sampel pada pengambilan pertama dan ketiga	111
Tabel 5.22 Harga rata-rata daya hambat serum penderita Puskesmas untuk sampel-sampel pada pengambilan pertama, kedua dan ketiga	111
Tabel 5.23 Harga rata-rata daya hambat serum penderita malaria <i>falciparum</i> dan malaria <i>vivax</i> di RSUD Mataram	113
Tabel 5.24 Korelasi antara daya hambat serum penderita malaria dengan kadar TNF	113

Tabel 5.25	Perbandingan daya hambat rata-rata serum penderita malaria berat dan malaria ringan	114
Tabel 5.26	Korelasi antara daya hambat serum dengan gejala klinik pada penderita malaria. <i>Falciparum</i>	114
Tabel 5.27	Korelasi antara daya hambat serum dengan gejala klinik pada penderita malaria. <i>vivax</i> di RSUD Mataram	115
Tabel 6.1	Perbandingan kadar TNF dengan hasil survei peneliti lain	127
Tabel 6.2	Rangkuman keberhasilan Uji Hipotesis	156



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Siklus hidup Plasmodium	18
Gambar 2.2 Siklus hidup Plasmodium vivax	19
Gambar 2.3 Morfologi Plasmodium	20
Gambar 2.4 Kurve kadar TNF dalam serum dan tingginya suhu tubuh pada penderita malaria vivax	35
Gambar 2.5 Bagan ringkasan dari penyebab-penyebab anemia yang dibuat oleh Roitt, <i>et al.</i> sebagai bahan perbandingan	38
Gambar 2.5 Elektronmikrografi dari kapiler otak yang dipadati oleh sel darah merah terinfeksi parasit malaria .	42
Gambar 2.6 Gambaran makroskopis otak penderita malaria serebral dengan bercak- bercak <i>perdarahan kecil</i>	42
Gambar 2.8 Peran TNF- α dan IFN- γ pada endotoksemia	48
Gambar 2.9 Produksi TNF dalam ko-kultur antara monosit dan sel darah merah terinfeksi parasit malaria	58
Gambar 3.1.1.a Patofisiologi malaria <i>falciparum</i> dan malaria <i>vivax</i>	66
Gambar 3.1.1.b Peran “blocking antibody” pada malaria <i>falciparum</i> dan malaria <i>vivax</i>	67
Gambar 3.1.1.c Patofisiologi dan peran “blocking antibody” pada malaria <i>falciparum</i>	68
Gambar 4.1 Alur Penelitian Bagian Pertama	81
Gambar 4.2 Alur Penelitian Bagian Kedua , kelompok pertama	82
Gambar 4.3 Alur Penelitian Bagian Kedua , kelompok kedua	83
Gambar 4.4 Penjelasan cara pembuktian aktivitas daya hambat faktor yang berada dalam serum penderita malaria secara <i>in vitro</i>	88

Gambar 5.1	Kurva kadar TNF rata-rata pada penderita malaria di RSUD Mataran	93
Gambar 5.2	Kurva longitudinal daya hambat serum penderita Puskesmas dengan L5	109
Gambar 5.3	Kurva longitudinal daya hambat serum penderita Puskesmas dengan G5	109
Gambar 5.4	Kurva harga rata-rata daya hambat serum pada penderita RSUD dan Puskesmas pada pengukuran longitudinal dengan metode L5	112



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data klinik dan laboratorium penderita malaria dari RSU Mataram	184
Lampiran 2	Data penderita Puskesmas Gangga dan Tanjung	189
Lampiran 3	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) untuk mengukur Kadar TNF	190
Lampiran 4	Pembiakan parasit malaria	191
Lampiran 5	Pembuatan antigen malaria	192
Lampiran 6	Pembiakan monosit	193
Lampiran 7	Stimulasi monosit dengan antigen malaria dan koleksi supernatan yang mengandung TNF- α	194
Lampiran 8	Pengukuran daya hambat serum penderita terhadap produksi TNF (inhibition assay)	195
Lampiran 9	Appendix 13.c. Total sample size required when using the Correlation coefficient (r)	196
Lampiran 10	Contoh-contoh perhitungan statistik	197
Lampiran 11	Korelasi Chloroquin, TNF dan parasitemia	202
Lampiran 12	Contoh pekerjaan uji awal menentukan pengenceran antigen dalam inhibition assay	203

DAFTAR SINGKATAN

Ag	: Antigen
Ab	: Antibodi
ADCC	: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ARDS	: Adult respiratory distress syndrome
BWF	: Black Water Fever
CD36	: Clusters of Differentiation nomor 36
CSP	: Circumsporozoite protein
DIC	: Disseminated intravascular coagulation
EDRF	: Endothelial derived relaxing factor
ELAM-1	: Endothelial leucocyte adhesion molecule-1
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
GM-CSF	: Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
G6PD	: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
Hb	: Haemoglobin
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule-1
IFN	: Interferon
IgG	: Imunoglobulin G
IgM	: Imunoglobulin M
IL-1	: Interleukin 1
IL-6	: Interleukin 6
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
I-RBC	: Infected Red Blood Cell
KLB	: Kejadian Luar Biasa
KLH	: Key-hole limpet hemocyanine
MHC	: Major Histo Compatibility
Mo	: Sel Monosit
mRNA	: messenger Ribonucleic Acid
NHS	: Normal Human Serum
NO	: Nitric Oxide
NOS	: Nitric Oxide Synthase
NTB	: Nusa Tenggara Barat
NTT	: Nusa Tenggara Timur
NRBC	: Normal Red Blood Cell
PAF	: Platelet Activating Factor
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PfEMP1	: <i>P. falciparum</i> infected erythrocyte membrane protein 1
PfHRP1	: <i>P. falciparum</i> histidine-rich protein 1
PGI-1	: Prostaglandin I-1
PGE-2	: Prostaglandin E-2
PKM	: Puskesmas, Pusat Kesehatan Masyarakat
PMN	: Polymorphonuclear leucocytes
RESA	: Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen

RSU	: Rumah Sakit Umum
Sel NK	: <i>Natural Killer Cell</i>
SGOT	: <i>Serum glutamic-oxaloacetic transaminase</i>
SGPT	: <i>Serum glutamic-pyruvic transaminase</i>
TACE	: <i>TNF-α converting enzyme</i>
TGF-beta	: <i>Transforming Growth Factor - beta</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR2	: <i>TNF-Receptor type 2</i>
UPF	: Unit Pelayanan Fungsional
VCAM-1	: <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Sebagai suatu penyakit tropis, malaria tersebar luas di 90 negara. Setiap tahun 300 sampai 500 juta orang menderita sakit malaria, seringkali malaria berat, dan 1,5 sampai 2,7 juta di antaranya meninggal (Trigg and Kondrachine, 1998). Usaha-usaha pemberantasan malaria, yang dulu menunjukkan hasil yang menggembirakan, kini tidak lagi demikian. Adanya kemunduran ekonomi dan konflik di banyak negara berkembang, menyebabkan usaha pemberantasan dihentikan. Resistensi parasit terhadap obat-obat malaria, dan resistensi nyamuk vektor malaria terhadap insektisida semakin tinggi dan meluas (Mithous and Kyle, 1998; Trigg and Kondrachine, 1998). Tingginya mobilitas penduduk meningkatkan penyebaran malaria dan kasus resisten obat, sehingga malaria menjadi salah satu "*re-emerging disease*" (Frick, 1997). Kemajuan transportasi menyebabkan malaria tidak hanya mengancam penduduk daerah endemik, tetapi juga penduduk daerah non endemik.

Di Indonesia sendiri, pada tahun 1995 disinyalir 93,5 juta penduduk menanggung risiko ketularan malaria setiap saat karena tinggal di daerah endemik (Rafei, 1997). Beberapa tahun terakhir, terdapat kecenderungan meningkatnya kasus secara drastis dan penyebaran ke daerah yang lebih luas. Adanya perubahan sosial-politik, krisis ekonomi dan terjadinya huru hara di berbagai daerah merubah peta malaria di Indonesia. Malaria, yang dalam beberapa dekade hanya menjadi masalah kesehatan di Luar Jawa dan Bali, kini juga tersebar di Jawa Barat, Jawa Tengah dan

Jawa Timur. Pada bulan Maret 1999, 9 Kabupaten di propinsi Jawa Tengah dinyatakan "terjangkit" malaria (Anonim b, 1999). Pada pertengahan tahun 1999, 349 orang terserang malaria di Kabupaten Pacitan dan Trenggalek (Anonim c, 1999) dan kasus juga meningkat di 6 kabupaten lain di Jawa Timur, yaitu Tulungagung, Blitar, Malang, Jember, Banyuwangi dan Sumenep (Kuntarijanto, 1999). Masalah resistensi obat yang sudah menjadi masalah sangat serius di Thailand dan dataran Indochina pada umumnya (Supajaisidhi, 1992; Loareesuwan, 1995), kini juga tersebar luas di Indonesia (Budiriyanto, *et al.*, 1992; Sungkar, 1992; Emiliana, *et al.*, 1993; Amran Ibrahim, 1997; Fryauff, *et al.*, 1998a; 1998b) termasuk di Lombok (Fryauff, *et al.*, 1997a).

Lombok, tempat dilaksanakannya penelitian ini, merupakan daerah pengembangan ekonomi dan tujuan pariwisata yang relatif baru, telah dinyatakan sebagai daerah malaria hipo-mesoendemik sejak beberapa tahun yang lalu dengan *parasite rate* 8 - 26 % (Dinkes Propinsi Nusa Tenggara Barat, 1990). Di RSU Mataram, malaria merupakan penyakit ketiga terbanyak yang dirawat di Ruang Penyakit Dalam (Budyono, *et al.*, 1991). Selama 18 bulan dalam tahun 1991-1992, 210 penderita dirawat inap, 101 orang (48,10%) merupakan kasus malaria berat dan dua orang meninggal karena malaria serebral (Soewignjo, *et al.*, 1992). Sejak awal tahun 1999, malaria dinyatakan mengganas lagi di Lombok dan tercatat delapan ledakan KLB (kejadian luar biasa) yang melibatkan 604 penderita dengan 7 diantaranya meninggal (Agus Sutanto, 1999; Anonim a, 1999).

Dari uraian di atas tersirat bahwa malaria merupakan problema kesehatan yang serius dan memerlukan penelitian-penelitian, baik dalam skala dunia maupun untuk

Indonesia sendiri. Sampai saat ini, di bidang penyakit tropis yang menjadi masalah bagi negara tropis, penelitian-penelitian justru dilakukan di dan oleh ahli-ahli dari negara maju. WHO, dengan programnya "*Roll back malaria*" menekankan perlunya menyertakan sumber daya lokal di setiap negara dalam pengendalian malaria dunia (Nabarro, 1999). Penelitian di bidang malaria oleh para peneliti Indonesia sendiri juga akan sangat membantu pemberantasan malaria di Indonesia yang dicanangkan dalam Program "Gebrak Malaria", baik secara langsung maupun guna pengembangan penanggulangan jangka panjang.

Parasit malaria mempunyai daur hidup yang kompleks ditandai munculnya stadium-stadium dengan morfologi dan karakteristik yang berbeda-beda.. Parasit ini juga mempunyai diversitas genetik yang besar serta dapat mengalami variasi antigen yang relatif cepat (Conway, 1997; Sutherland, 1998). Oleh karena itu, penduduk daerah endemik memperoleh kekebalan dengan sangat lambat. Imunitas hanya dapat diperoleh dengan pemaparan yang berulang-ulang dan kontinu, dan kekebalan yang *solid* juga sukar diperoleh; biasanya yang diperoleh hanya *non-sterilizing immunity*, di mana individu tidak lagi menunjukkan gejala klinik namun tetap mengandung parasit meskipun dalam jumlah kecil (Druilhe, 1987; Mohan and Stevenson, 1998). Kekebalan ini juga berumur pendek (Ho and Sexton, 1995). Sehubungan dengan sifat-sifat parasit tersebut, para ahli menemui kesukaran mengidentifikasi dan mengembangkan vaksin yang dapat melindungi manusia dari infeksi malaria, yang efektif untuk semua stadium dan bisa dipakai di berbagai daerah endemik (Sher, 1988; Doolan and Hoffman, 1999).

Di daerah endemik tinggi dan transmisi stabil, parasitemia tinggi dan gejala klinik yang jelas dan berat, hanya ditemukan pada anak-anak dengan umur relatif muda. Anak-anak yang lebih besar terhindar dari serangan/gejala klinik meskipun terkadang masih mengalami lonjakan parasitemia tinggi. *Non sterilizing immunity* diperoleh pada umur dewasa muda (di atas 15 tahun); penderita selain terhindar dari gejala penyakit, jumlah parasit yang dikandung juga sangat menurun. Saat diperolehnya status kekebalan masing-masing tahap di atas, sangat tergantung kepada derajat dan lamanya transmisi atau pemaparan (Boudin, *et al.*, 1994).

Dengan memperhatikan adanya tahapan-tahapan dalam timbulnya kekebalan pada malaria tersebut, dan bahwa "*anti-disease immunity*" (imunitas yang mencegah timbulnya gejala) muncul beberapa tahun mendahului timbulnya "*anti-parasite immunity*", Playfair, *et al.* (1991a, 1991b) mengemukakan gagasan pembuatan "*anti-disease vaccine*" sebagai alternatif oleh karena usaha pembuatan "*anti-parasite vaccine*" sampai sekarang belum menunjukkan hasil yang menggembirakan.

Namun sebelum itu, perlu diketahui proses yang menyebabkan timbulnya *disease* pada malaria. Perlu dipelajari mediator-mediator yang terlibat dalam timbulnya gejala malaria tersebut, dan mengapa malaria memberi gejala *multiorgan*, dan bagaimana terjadinya imunitas yang menghindarkan penderita dari gejala malaria.

Identifikasi Masalah.

Lebih dari dua dekade yang lalu Clark menandai adanya kemiripan gejala klinik malaria dengan gejala endotoksemia yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif, di mana Tumor Necrosis Factor (TNF) menjadi mediator utama (Clark, 1978).

Kemudian ditemukan bahwa TNF juga meningkat kadarnya pada penderita malaria, dan dalam beberapa penelitian ditemukan korelasi antara kadar TNF yang tinggi dengan gejala malaria berat (Clark, et al., 1981; Clark, 1987a; 1987b; Grau, et al., 1989b; 1989d; Butcher, et al., 1990; Kwiatkowski, et al., 1990). Selanjutnya fakta tersebut didukung oleh temuan pada hewan percobaan (Grau, et al., 1987; Miller, et al., 1989); dan temuan laboratorium menunjukkan bahwa kultur bareng (*co-culture*) antara monosit dan parasit malaria dapat merangsang monosit untuk memproduksi TNF (Bate, et al., 1988; Picot, et al., 1990). Dan ternyata beberapa antigen malaria, dapat merangsang produksi TNF pada monosit, dan kadar TNF yang dihasilkan dipengaruhi oleh dosis antigen yang digunakan (Taverne, et al., 1990a; 1990b; 1990c; Picot, et al., 1993; Bate and Kwiatkowski, 1994a). Oleh karena itu para ahli beranggapan, bahwa TNF merupakan mediator utama dalam terjadinya malaria. Tetapi terdapat perbedaan-perbedaan dalam laporan mengenai hubungan tingginya kadar TNF dalam serum dengan beratnya gejala klinik malaria (Kwiatkowski, et al., 1989b; Butcher, et al., 1990; Clark and Cowden, 1999).

Menurut Greenwood, et al. (1991), dibutuhkan *cut off value* tertentu dalam jumlah parasit untuk timbulnya gejala klinik malaria. Sementara derajat parasitemia 5% sudah dinyatakan sebagai kasus malaria berat, ada penderita yang mengandung parasit 30% tetapi dapat sembuh dengan sempurna (Warrell, et al., 1990). Oleh karena itu perlu ditentukan apakah tingginya derajat parasitemia yang ditemukan pada penderita-penderita di daerah hipo-mesoendemik Lombok juga mempunyai peran dalam menentukan beratnya gejala klinik malaria, dan bagaimana hubungannya

dengan kadar TNF, bila mengingat adanya faktor "*dose-dependent*" dalam stimulasi produksi TNF.

Seperti dinyatakan di atas, antigen-antigen malaria, misalnya *exo-antigen* yang dihasilkan dari supernatan biakan *P. falciparum*, bila disuntikkan kepada tikus, juga akan menimbulkan gejala toksik seperti pada malaria (Clark, 1987a, 1987b; Bate, *et al.*, 1989; Playfair, *et al.*, 1991a). Dan ternyata *exo-antigen* ini dapat menggugah respons imun dengan terbentuknya *blocking antibody* yang pada percobaan *in vitro* terbukti dapat menghambat produksi TNF pada kultur monosit yang dirangsang dengan antigen malaria. Antibodi ini diidentifikasi sebagai IgM dan bersifat *T-independent*, jadi hanya ditemukan dalam jangka waktu relatif singkat, cepat menghilang (Bate, *et al.*, 1990; Taverne, *et al.*, 1990b). Antibodi serupa juga terdeteksi pada seorang penderita malaria *falciparum* akut dan seorang penderita malaria *vivax* akut, dan para penderita ini merupakan penduduk Eropa yang baru saja pulang dari daerah endemik di Afrika (Bate, *et al.*, 1994b). Dengan mengingat sifat-sifat khusus gejala malaria serta respon imun yang berbeda pada penderita di daerah dengan endemisitas rendah seperti di Lombok, perlu diteliti apakah antibodi semacam itu juga terdapat di sana.

Berlainan dengan penduduk daerah dengan transmisi stabil, di mana kasus malaria berat ditemukan paling sering pada anak-anak, maka pada penduduk yang berasal dari daerah non endemik seperti para transmigran dari Jawa yang berada di Irian Jaya (Papua), orang dewasa justru lebih sering menunjukkan gejala malaria berat dari pada anak-anak (Baird, *et al.*, 1998; Riley, 1999). Juga di Thailand, Vanuatu dan Sri Lanka, di mana transmisi malaria tidak stabil, insiden malaria serebral justru

meningkat dengan bertambahnya usia (Fribourgh-Blanc, *et al.*, 1985; Tharavanij, *et al.*, 1984; Riley, 1999).

Berlainan dengan Flores, Nusa Tenggara Timur, yang menunjukkan *parasite rate* rata-rata populasi jauh lebih tinggi, yaitu 11- 39,9% (Harjani dan Martono, 1991)) dan jumlah kasus tertinggi ditemukan pada umur di bawah 4 tahun (dapat sampai 50,9%), di Lombok kasus malaria lebih banyak ditemukan pada orang dewasa. Kecenderungan ini dapat dilihat pada kasus malaria yang dirawat di Ruang Penyakit Dalam berjumlah 305 orang selama dua tahun, Nopember 1988 sampai dengan Oktober 1989 (Budyono, *et al.*, 1991), sedangkan di UPF Kesehatan Anak sebanyak 33 orang pada lebih kurang kurun waktu yang sama (Djelantik, *et al.*, 1991). Angka perbandingan yang hampir serupa juga ditemukan di Puskesmas Sekotong, Kecamatan Lombok Barat, di mana angka kunjungan karena malaria pada anak-anak umur 1 - 4 tahun adalah 10,8 - 16,4% dari seluruh penduduk dengan umur yang sama dibandingkan dengan 27,4% pada penduduk umur 5 - 14 tahun dan 21,7% pada penduduk umur 15 - 44 tahun (Candradikusuma, 1994).

Penelitian yang dilakukan pada tahun 1991 oleh Tim Malaria dari Tropical Disease Research Center Universitas Airlangga di antara anak-anak umur 0-9 tahun di 3 desa di Kabupaten Lombok Barat, menghasilkan *parasite rate* 12,7-21,42% (Dachlan, *et al.*, 1991), sedang pada penelitian lanjutan yang lebih terinci di tiga dusun di antaranya (dusun merupakan bagian dari desa) pada tahun 1992 - 1993 menghasilkan indeks limpa di antara anak-anak umur 2 - 9 tahun sebesar 9 - 26,7%. Sedang *parasite rate* menunjukkan adanya variasi musiman yang berbeda-beda tergantung daerahnya, dengan angka tertinggi pada bulan Agustus yaitu 11,5 - 21% dan angka terendah 0 -

9% pada bulan April dan Juli berikutnya, dan ini didukung dengan deteksi larva nyamuk yang bervariasi dengan densitas rata-rata tertinggi pada bulan Agustus dan terendah pada bulan April/Juni tahun berikutnya, serta kurva *seropositive rate* terhadap antigen CSP (*circumsporozoite protein*) yang sangat berfluktuasi. Bila dirinci kasus anak-anak (0-15 tahun) pada bulan Agustus menunjukkan angka 8,2 – 20% sedang orang dewasa (>15 tahun) 18,8 – 24% (Dachlan, *et al.*, 1994; Soedarto, *et al.*, 1994; Sri-Hidajati, *et al.*, 1994).

Selanjutnya penelitian sero-epidemiologi menggunakan *crude antigen* pada tahun 1991 menghasilkan *seropositive rate* 28,9-50,3% (Sri-Hidajati, *et al.*, 1992), dan penelitian longitudinal pada tahun 1992-1993 menunjukkan *seropositive rate* 14,9-64,9% untuk antigen CSP (*Circumsporozoit protein*) dan 18,9-51,8% untuk antigen RESA (*ring-infected erythrocyte surface antigen*) dengan pola kurva *parasite rate* dan serologi yang landai, khas bagi sebuah daerah dengan endemisitas rendah (Sri-Hidajati, *et al.*, 1997).

Data-data *parasite rate*, *seropositive rate*, indeks limpa dan indikator kepadatan nyamuk di atas, semuanya menunjukkan bahwa Lombok merupakan daerah hipo sampai dengan mesoendemik, dengan tingkat transmisi yang tidak stabil.

Selain berbeda dalam tingkat endemisitas malaria, Lombok yang merupakan daerah Indonesia, dapat menunjukkan respon imun yang berbeda dari negara lain. Hal ini telah diamati oleh Jensen, *et al.*(1984), bahwa respon imun pada penderita malaria di Flores lebih bersifat humoral bila dibanding dengan penderita malaria di Sudan yang lebih bersifat seluler. Hal yang juga berbeda di Lombok dari laporan peneliti dari daerah lain, yaitu ditemukannya korelasi positif antara *parasite rate* dengan

tingginya titer antibodi terhadap RESA (Sri-Hidajati, *et al.*, 1997), yang menyatakan bahwa respon pembentukan antibodi di daerah dengan *inoculation rate* yang rendah tidak cukup memberikan proteksi. Hal ini berbeda dengan hasil survey di daerah hiper- atau holo-endemik (*parasite rate* >50% untuk daerah hiperendemik dan >75% untuk daerah holoendemik) seperti di desa-desa Kenya (Deloron, *et al.*, 1989) dan Liberia (Petersen, *et al.*, 1990), frekuensi sediaan positif di kedua negara Afrika itu menunjukkan korelasi negatif dengan reaktivitas serologi terhadap antigen-antigen RESA dan CSP.

Di RSUD Mataram, tampaknya jumlah kasus *P. falciparum* tidak dominan. Di UPF Kesehatan Anak, dari 33 anak penderita malaria, penderita *P. falciparum* hanya 45% (Djelantik, *et al.*, 1991), sedang di ruang Penyakit Dalam 43,33% adalah *P. falciparum*, 48% adalah *P. vivax* (Soewignjo, *et al.*, 1992). Dengan mengingat bahwa gejala malaria berat pada umumnya lebih banyak ditemukan pada malaria *falciparum* (Cheesbrough, 1987; Warrell, *et al.* 1990), maka bagaimana pada kasus-kasus malaria *vivax* di RSUD Mataram, dan perlu diteliti peran TNF pada timbulnya gejala klinik pada penderita malaria *vivax*.

Terdapat laporan-laporan bahwa galur dan keganasan (*virulence*) parasit sangat menentukan dalam timbulnya gejala malaria dan daya stimulasi produksi TNF *in vitro* (Greenwood, *et al.*, 1991; Allan, *et al.*, 1993; Picot, *et al.*, 1993; Allan, *et al.*, 1995). Tetapi Bate dan Taverne (Bate, *et al.* 1992b; 1994c; Taverne, *et al.* 1990b) menyatakan bahwa ada reaksi silang dalam efek *blocking antibody* di antara species dan galur-galur parasit malaria. Oleh karena adanya kontroversi tersebut, perlu diteliti ada atau

tidak adanya reaksi silang antara *P. falciparum* dan *P. vivax*, serta antara galur-galur *P. falciparum* yang berasal dari berbagai daerah endemik malaria di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah.

Dari permasalahan-permasalahan yang dikemukakan di atas, dapat dirumuskan pertanyaan-pertanyaan sebagai berikut :

1. Apakah tingginya derajat parasitemia pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok, berpengaruh terhadap beratnya gejala klinik malaria?
2. Bagaimana profil kadar TNF pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok?
3. Apakah terdapat perbedaan kadar TNF antara penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*?
4. Apakah kadar TNF di dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* mempunyai korelasi dengan derajat parasitemia?
5. Apakah kadar TNF di dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* mempunyai korelasi dengan gejala klinik malaria?
6. Apakah di dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok ditemukan aktivitas faktor yang bisa menghambat produksi TNF?
7. Apakah terdapat perbedaan daya hambat produksi TNF antara serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* ?

8. Apakah daya hambat produksi TNF dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* juga berperan dalam menurunkan kadar TNF ?
9. Apakah daya hambat terhadap produksi TNF dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* ini juga berperan dalam menurunkan gejala klinik malaria?
10. Apakah terdapat perbedaan daya hambat produksi TNF dalam serum penderita malaria terhadap stimulasi produksi TNF oleh antigen yang dibuat dari galur *P. falciparum* yang berasal dari Lombok dan galur *P. falciparum* yang berasal dari Irian Jaya?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum :

1. Menentukan peran TNF dalam timbulnya gejala klinik malaria pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.
2. Menentukan besarnya daya hambat serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik terhadap produksi TNF dan menentukan korelasi daya hambat tersebut dengan penurunan gejala klinik malaria.

1.3.2 Tujuan Khusus :

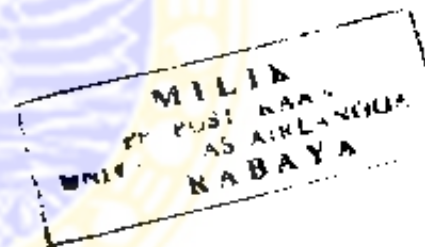
Dalam mencapai tujuan umum tersebut di atas, penelitian dibagi menjadi dua bagian.

Tujuan Khusus Penelitian Bagian Pertama :

1. Menentukan korelasi antara derajat parasitemia dengan beratnya gejala klinik pada penderita malaria *falciparum* dan penderita malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.
2. Mengukur kadar TNF dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* secara longitudinal dan mengevaluasi fluktuasinya.
3. Membandingkan kadar TNF dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.
4. Menentukan korelasi antara kadar TNF dengan derajat parasitemia pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.
5. Menentukan korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik malaria pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.

Tujuan Khusus Penelitian Bagian Kedua.

1. Menentukan besarnya daya hambat serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok terhadap produksi TNF, dan mengevaluasi fluktuasi daya hambat tersebut secara longitudinal sampai masa konvalesen.
2. Membandingkan besarnya daya hambat produksi TNF terhadap stimulasi produksi TNF oleh antigen dari galur *P. falciparum* yang berasal dari Lombok dan dari Irian Jaya.



3. Membandingkan besarnya daya hambat produksi TNF dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.
4. Menentukan korelasi besarnya daya hambat produksi TNF yang diukur secara *in vitro* dengan penurunan kadar TNF dalam serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.
5. Menentukan korelasi besarnya daya hambat produksi TNF pada serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* dengan penurunan gejala klinik malaria.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat akademis dan teoretis:

Penelitian ini mempelajari respon imun yang bersifat patologis bagi penderita dan peran sitokin sebagai mediator di dalamnya, serta adanya respon yang dapat menghambat produksi mediator tersebut. Respon imun pada malaria telah banyak sekali dipelajari dan dipublikasi, namun hasilnya banyak yang bertentangan dan sebagian lagi menimbulkan pertanyaan baru. Oleh karena itu hasil penelitian yang sekecil apapun akan dapat berpartisipasi dalam ikut mengurai hal yang ruwet tersebut, atau menambah pertanyaan baru bagi penelitian lebih lanjut.

Manfaat praktis :

1. Di Indonesia, di mana malaria merupakan penyakit infeksi rakyat yang penting, data-data dan penelitian mengenai malaria masih sedikit. Oleh karena itu, hasil

penelitian ini dapat menambah khasanah dan data mengenai malaria di Indonesia yang mempunyai tingkat endemisitas yang beragam. Apalagi dengan kebijakan WHO yang dinyatakan dalam programnya *roll back malaria*, maka keterlibatan peneliti dan penelitian di negara endemik sendiri sangat dianjurkan.

2. Dengan mengetahui mekanisme patogenesis serta mengetahui mediator yang tepat bagi timbulnya gejala klinik, dapat dicari obat atau cara untuk mencegah timbulnya gejala fatal tanpa harus menunggu efek parasitisidal dari obat anti-malaria yang mungkin sudah resisten.
3. Dengan mengetahui antigen penyebab langsung timbulnya gejala malaria, dapat dibuat vaksin untuk mencegah timbulnya gejala (*anti-disease vaccine*) sebagai vaksin alternatif terhadap vaksin anti-parasit.
4. Dengan mengidentifikasi antibodi yang dapat langsung memblokir timbulnya gejala malaria, dapat diproduksi antiserum atau fraksi antibodi spesifik yang dapat digunakan untuk mengurangi gejala bila individu sudah terinfeksi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Parasit Penyebab Malaria dan Daur Hidupnya.

Parasit penyebab malaria adalah *Protozoa* dari klas *Sporozoa*, subklas *Coccidia*, keluarga *Plasmodiidae* dan genus *Plasmodium*. Ada empat species yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale* (Faust, Russell and Jung, 1970). Genus *Plasmodium* ini mempunyai daur hidup yang sangat kompleks. Pengetahuan mengenai daur hidup ini sangat diperlukan untuk bisa memahami patologi, patogenesis dan gejala klinik penyakit malaria serta bagaimana cara mengatasi dan mencegah penularan penyakit ini.

Daur hidup parasit malaria dapat dibagi menjadi dua, yaitu daur hidup aseksual yang berlangsung di dalam tubuh manusia, dan daur seksual yang berlangsung di dalam tubuh nyamuk vektor. Berbagai species nyamuk dari genus *Anopheles* dapat bertindak sebagai vektor.

Siklus di dalam tubuh manusia dimulai dengan masuknya sporozoit ke dalam tubuh manusia dengan jalan gigitan nyamuk, yang dalam sekali gigitan dapat membawa rata-rata 12-20 sporozoit. Sporozoit kemudian mengikuti aliran darah atau limfe, dan dalam waktu lebih kurang 30 sampai 60 menit sudah sampai ke dalam hepar. Di organ ini sporozoit akan memasuki sel parenkim, berubah menjadi trofozoit dan menjalani tumbuh kembang menjadi sizon yang berinti banyak. Sizon dengan ukuran sekitar 100 mikron ini kemudian membelah diri dan menghasilkan 10.000

hingga 30.000 merozoit (Druilhe, Renia and Fidock., 1998). Tahap perkembangan di dalam sel hati ini disebut sebagai siklus exo- atau pre- eritrositik, dan berlangsung rata-rata 7 sampai 8 hari pada *P. vivax*, 5 sampai 6 hari untuk *P. falciparum*, 13 sampai 16 hari untuk *P. malariae*, dan 9 hari untuk *P. ovale* (Faust, Russell and Jung, 1970). Pada akhir dari tahap ini, merozoit tercurah ke dalam sirkulasi darah untuk memulai siklus eritrositik..

Pada *P. vivax* dan *P. ovale*, terkadang bentuk-bentuk di dalam hepar ini menjadi bentuk hipnozoit, yaitu bentuk "tidur", yang berkembang sangat lambat dan dapat tinggal di dalam hati dalam waktu yang lama untuk sewaktu-waktu "bangun" dan memulai sizogoni baru, sehingga jumlah parasit dalam darah meningkat lagi (Druilhe, Renia and Fidock., 1998; WHO, 1987). Peristiwa ini mengakibatkan keadaan yang disebut *relapse* atau kumat, yang harus dibedakan dengan apa yang disebut *recrudescence* atau kambuh..

Siklus aseksual eritrositik dimulai dengan tercurahnya merozoit dari hati ke sirkulasi darah. Merozoit-merozoit akan mencari sel darah merah untuk dimasuki. Setelah invasi ini, parasit hidup di dalam sitoplasma eritrosit sebagai trofozoit muda yang berbentuk cincin, kemudian tumbuh menjadi trofozoit dewasa dengan masa sitoplasma yang meningkat dan intinya kemudian membelah menjadi semakin banyak sehingga menjadi sizon dewasa. Jumlah inti pada sizon dewasa berbeda-beda sesuai dengan species, yaitu 8-12 pada *P. malariae*, sampai 24 pada *P. vivax*, sedang pada *P. falciparum* dapat sampai 32. Sizon dewasa akan pecah bersama sel hospesnya, keluarlah merozoit-merozoit. Merozoit di dalam sirkulasi darah akan mencari sel darah merah yang baru untuk memulai siklus yang baru. Satu siklus di dalam sel darah

merah ini berlangsung 48 jam pada *P. vivax*, 36–48 jam pada *P. falciparum*, sekitar 72 jam pada *P. malariae* dan 48-50 jam pada *P. ovale* (Faust, Russell and Jung, 1970).

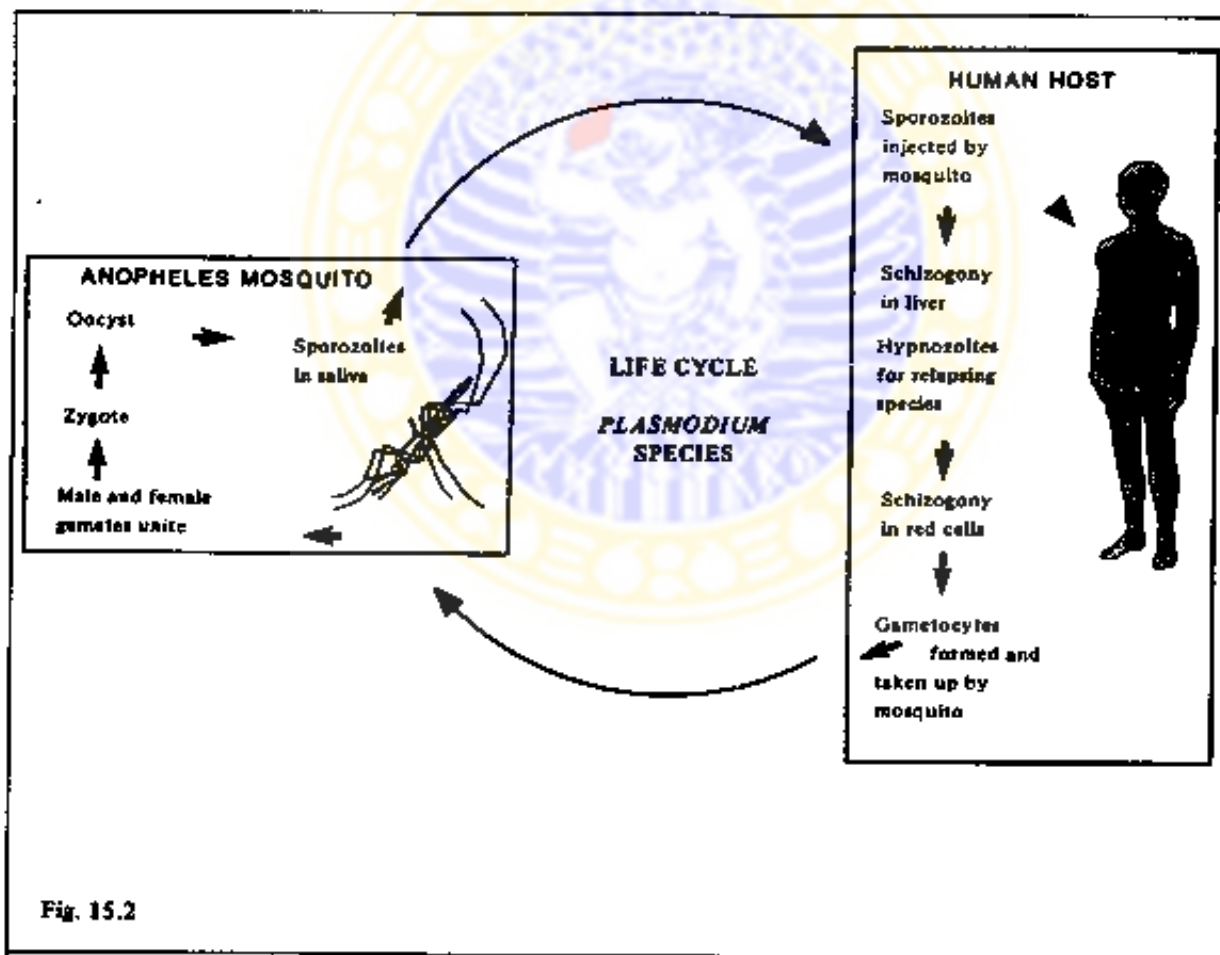
Setiap species Plasmodium mempunyai preferensi hospes eritrosit yang berbeda: *P. vivax* dan *P. ovale* menyukai eritrosit muda (retikulosit), *P. malariae* eritrosit dewasa, dan *P. falciparum* dapat menginfeksi eritrosit muda maupun dewasa (Faust, Russell and Jung, 1970; White and Plorde, 1991). Preferensi terhadap eritrosit ini ikut menentukan kecepatan meningkatnya parasitemia, karena bagi merozoit *P. vivax* misalnya, akan sukar memperoleh retikulosit sebagai sel hospes baru dibandingkan dengan *P. falciparum* yang menyukai eritrosit muda maupun dewasa (White, 1998).

Pada *P. falciparum*, hanya bentuk cincin yang beredar dalam darah tepi. Stadium-stadium yang lebih tua akan mengalami “sekuestrasi”, dan tinggal atau berada di dalam pembuluh-pembuluh darah kecil di dalam organ-organ tertentu. Oleh karena itu, bentuk-bentuk lanjut ini tidak ditemui dalam sediaan tetes tebal maupun hapusan darah dari penderita malaria *falciparum*, kecuali pada penderita *agonal*.

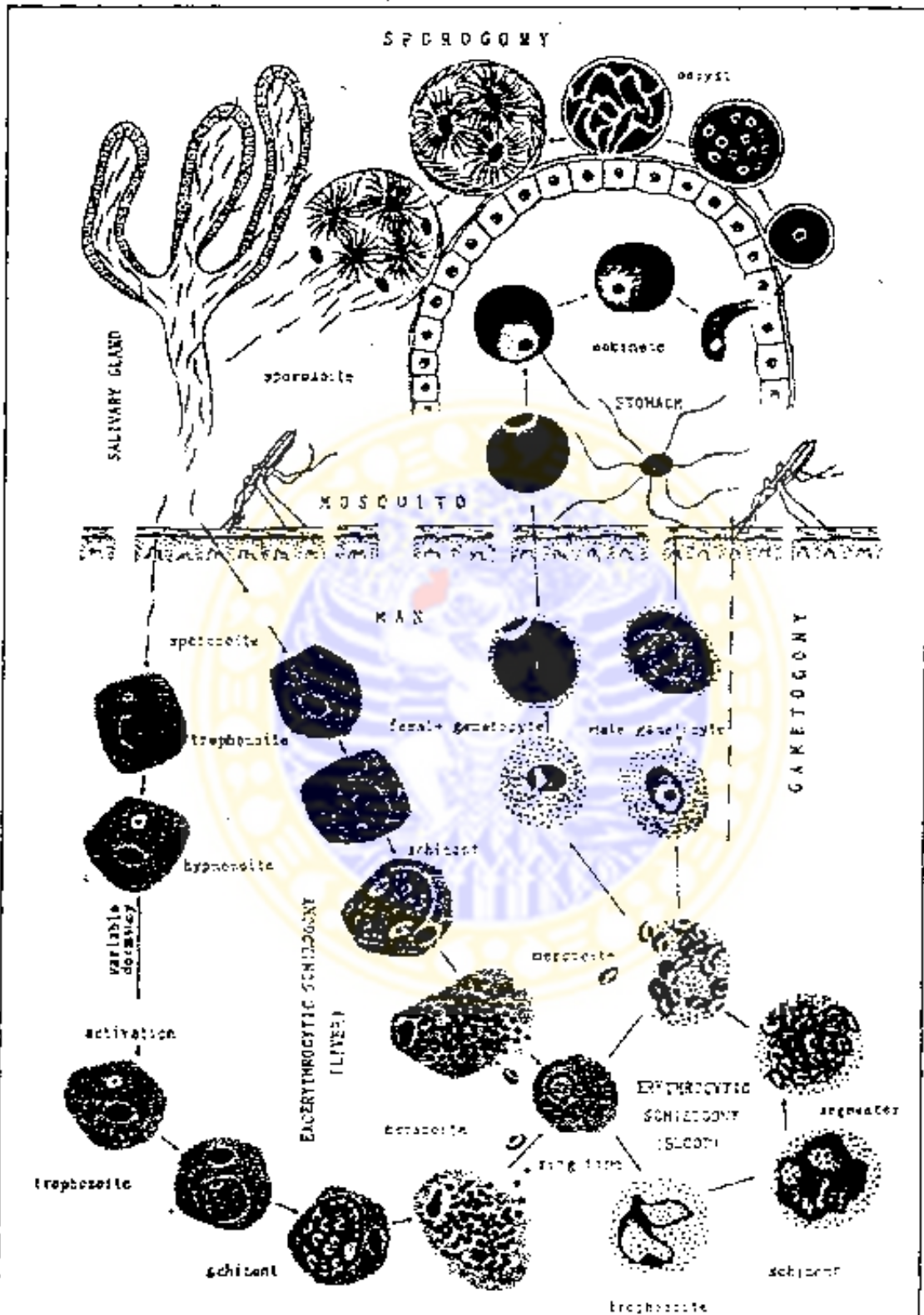
Plasmodium mengkonsumsi protein terutama hemoglobin dari sel hospes dan menghasilkan pigmen hemozoin sebagai metabolitnya. Pigmen ini di deposisi dan menumpuk di dalam sitoplasma pada sizon dewasa dan gametosit dewasa (Rosenthal and Meshnick, 1998).

Setelah menjalani beberapa siklus aseksual di antara eritrosit, sebagian merozoit yang masuk ke sel eritrosit yang baru, diprogram untuk tidak berkembang menjadi sizon, melainkan menjadi bentuk seksual : gametosit jantan dan betina. Bentuk-bentuk seksual ini tetap berada dalam sirkulasi darah dalam beberapa hari sampai dua minggu. Bila kebetulan ada nyamuk *Anopheles* betina menggigit,

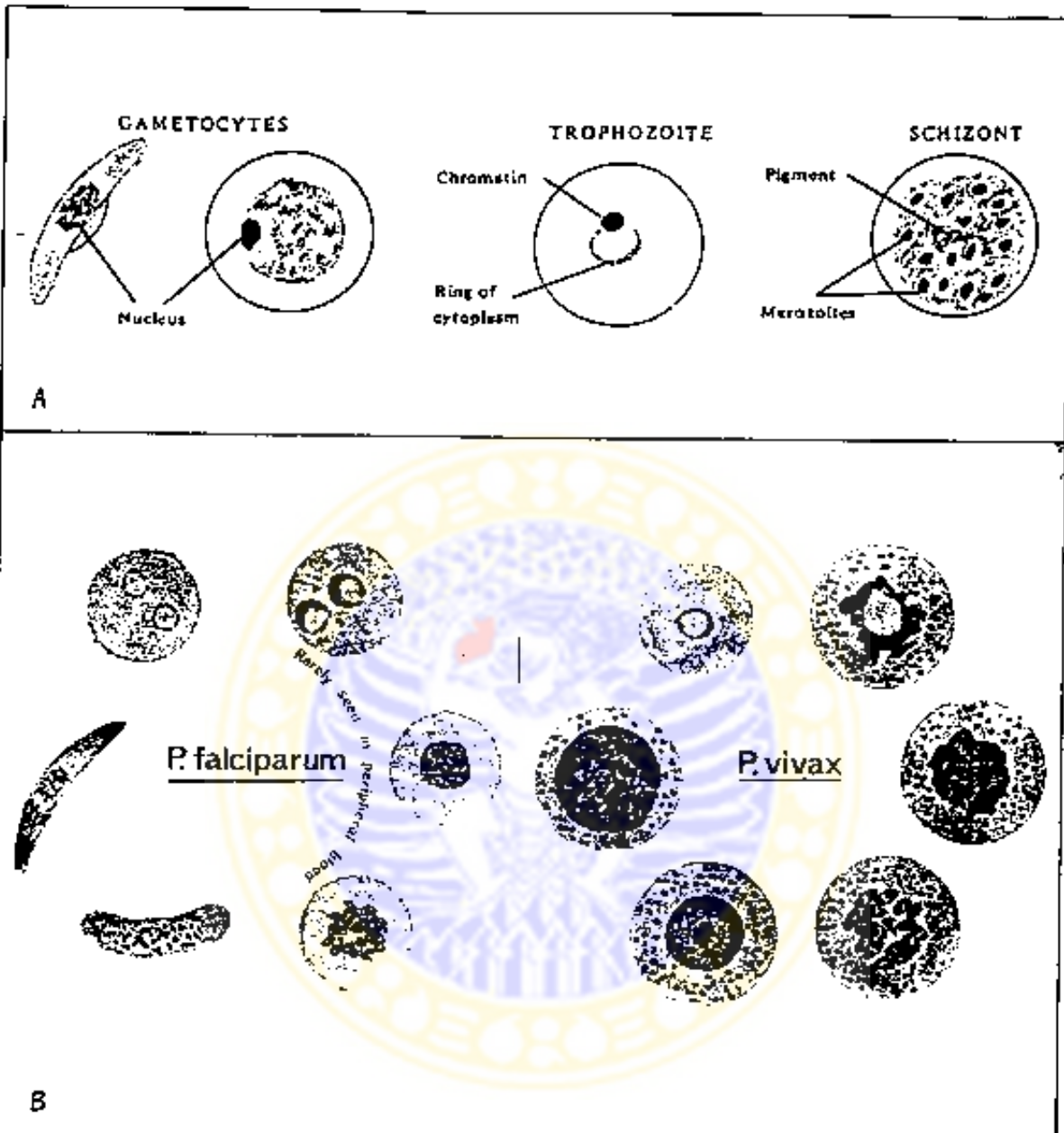
gametosit ikut terisap, dan di dalam tubuh nyamuk, mereka akan berkembang, mengalami fertilisasi dan reproduksi, menghasilkan beribu-ribu (100 - 100.000) sporozoit, yang bermigrasi kearah kelenjar ludah, dan kemudian menunggu di sana, sampai nyamuk menggigit manusia lagi. Lamanya sporogoni di dalam tubuh nyamuk ini 8 - 20 hari, tergantung kepada species *Plasmodium* dan suhu udara. Sporozoit di dalam kelenjar ludah nyamuk dapat tetap hidup sampai 30 - 40 hari, (Beier, 1993). Siklus hidup *Plasmodium* ini dapat dilihat pada gambar 2.1, 2.2 dan 2.3.



Gambar 2.1 Garis besar siklus hidup *Plasmodium*. Sumber : Cheesbrough, 1987 fig 15.2.



Gambar 2.2 Siklus hidup *P. vivax*. Disebelah kiri bawah dapat dilihat adanya kemungkinan fase laten di dalam hati yang dapat menyebabkan *relapse*. Sumber : Bruce-Chwatt's Essential Malariaology 3rd ed. London: Arnold, Hodder Headline Group, 1993.



Gambar 2.3 Morfologi *Plasmodium* stadium eritrositik. A. Beberapa stadium penting di dalam siklus eritrositik. B. Perubahan bentuk dalam siklus eritrositik pada *P. vivax* dan *P. falciparum*.

Sumber : Cheesbrough, 1987 dan Jeffrey HC and Leach RM, 1972 : Atlas of Medical Protozoology and Helminthology. London : Churchill Livingstone pl 47.

2.2 Gejala Klinik Malaria

Malaria ditandai dengan serangan demam yang periodik dan intermiten. Serangan demam pada malaria berlangsung tiga tahap, dimulai dengan rasa dingin dan menggigil yang disebut *rigor*, kemudian suhu meningkat hingga mencapai puncak, diakhiri keluarnya keringat dan menurunnya suhu, dan penderita merasa sehat kembali sampai serangan panas berikutnya (Cheesbrough, 1987). Irama demam tersebut berjalan seiring dengan siklus sizogoni di dalam sel darah merah. Timbulnya panas bersamaan waktunya dengan pecahnya sizon dan eritrosit yang dihuninya (Pasvol, *et al.*, 1995; Playfair, *et al.*, 1990). Tergantung kepada parasit penyebabnya, episode panas dapat berjenis tertiana seperti malaria *vivax* atau kuartana seperti malaria *malariae*. Malaria *falciparum* pada umumnya tertiana, namun seringkali bervariasi sedemikian sehingga tidak khas.

Diantara keempat species penyebab malaria pada manusia, *P. falciparum* memberikan gejala paling berat dan dapat menyebabkan timbulnya komplikasi-komplikasi.

Masa tunas malaria berlangsung 7-14 hari, dan gejala dapat timbul beberapa hari sebelum atau sesudah parasit mulai tampak pada sediaan darah tepi (*patency*), yaitu sekitar 11-12,5 hari (Harpaz, *et al.*, 1992; Manson & Bahr, 1985). Gejala dimulai dengan rasa tidak enak badan, malaise, nyeri kepala, nyeri otot, nyeri sendi, anoreksia, mual, kepala terasa berat, sakit perut dan batuk, yang mendahului timbulnya demam. Panas dapat berupa sumer saja, tapi dapat pula tinggi dan menjadi hiperpireksia melampaui 40^o Celcius. Nadi dapat mula-mula pelan (bradikardia), tapi kemudian menjadi cepat bila terjadi *rigor*. Anemia merupakan gejala penting dari malaria, dan

merupakan jenis hemolitik, normositik dan normochromik. Pada malaria berat, anemia bisa terjadi dini (White and Plorde, 1991). Dapat terjadi hemolisis intravaskuler dan hemoglobinuria.

Hati dapat membesar dengan konsistensi lunak pada infeksi akut. Biasanya juga ditemukan gangguan faal hati. Pembesaran hati kronis juga sering terjadi dan merupakan akibat dari penimbunan pigmen dan fibrosis dari sistim portal. Dapat terjadi ikterus (Manson and Bahr, 1989). Limpa juga membesar dan splenomegali merupakan petunjuk adanya semi-imunitas. Pembesaran limpa kronis terutama ditemukan pada infeksi *Plasmodium vivax* (Cheesbrough, 1987).

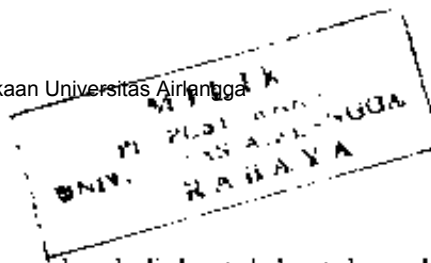
Urine dapat mengandung albumin, urobilin dan silinder hialin.

Sering terjadi hipoglikemia yg menyebabkan penderita lemah, berkeringat dingin, dan mengalami perubahan kesadaran. Biasanya disertai acidosis laktat. Kejadian hipoglikemia meningkat pada penggunaan Quinine (Cheesbrough, 1987).

Parasitemia dapat meningkat sekali. Meskipun ada penderita yang dapat menanggung parasitemia lebih tinggi (30-40% pada *P. falciparum*), pada umumnya parasitemia di atas 5% dianggap fatal (Warrell, *et al.*, 1990). Evaluasi parasit sangat diperlukan untuk *follow up* pengobatan.

Gametosit biasanya tidak ditemukan pada serangan primer, tapi dapat dideteksi pada penderita semi-imun dan imun, sering tidak disertai gejala dan tidak ditemukan stadium lain dari parasit.

Pada malaria, sering ditemukan kekambuhan atau kumat, rekrudesensi atau relaps. Untuk kepentingan pengobatan, perlu dibedakan penyebabnya. Rekrudesensi atau *short term relapse*, adalah kembalinya (*recurrence*) gejala malaria pada infeksi



primer, yang disebabkan oleh meningkatnya kembali bentuk-bentuk aseksual darah yang tadinya sudah menurun sampai tingkat subklinik. Ini dapat berlangsung beberapa minggu atau bulan sesudah serangan pertama. Rekrudesensi dapat terjadi karena pengobatan yang tidak memadai, karena resistensi terhadap obat yang digunakan, atau bila terjadi penurunan imunitas (Cheesbrough, 1987). Relaps atau kumat yang sesungguhnya, terjadi pada malaria vivax atau malaria ovale, karena adanya bentuk *hipnozoit* di dalam sel hati, yang menjadi sumber dan meningkatkan kembali jumlah parasit dalam sirkulasi darah (lihat bab 2.1). Relaps dapat timbul 8-10 minggu sesudah serangan sebelumnya, disebut *short term relapse* atau 30-40 minggu kemudian disebut *long term relapse*. Dalam pengalaman, tidak mudah membedakan kedua macam kekambuhan tersebut (Milhous and Kyle, 1998).

Pada infeksi *P. falciparum*, malaria dapat menjadi berat dengan timbulnya komplikasi-komplikasi. Malaria serebral merupakan komplikasi paling berat dan merupakan penyebab kematian utama pada anak-anak di Afrika. Gejala utama adalah turunnya kesadaran sampai *unrousable comma*. Prognosis jelek bila malaria serebral disertai tanda-tanda deserebrasi, tiadanya refleks kornea, konvulsi, umur kurang dari tiga tahun, hipoglikemia, leukositosis, hiperparasitemia, kadar alanin dan 5-nukleotidase yang meningkat, kadar laktat yang meningkat dalam plasma dan cairan sungsung (Molineux, *et al.*, 1989). Meskipun mortalitas dapat sampai 10-50% (Warrell, *et al.*, 1990), tetapi mereka yang sembuh, hanya sedikit yang mengalami cacat. Kecacatan nerologis dapat berupa hemiparesis, hipotonia umum, spastisitas, ataksia, tuli dan buta, yang bisa bersifat transien dan berkurang dalam beberapa minggu (Melancon-Kaplan, *et al.*, 1993; Molineux, *et al.*, 1989; Polder, *et al.*, 1989).

Minimnya kecacatan yang tersisa menimbulkan banyak perdebatan dalam menerangkan patogenesis malaria serebral ini (Warrell, *et al.*, 1990).

Black water fever (BWF), biasanya berkaitan dengan hemolisis intravaskuler berat dan tidak ada hubungannya dengan tingginya parasitemia, bahkan kadangkala tidak ditemukan parasit. Hemolisis dapat terjadi pada eritrosit yang terinfeksi maupun yang tidak, dan menyebabkan hemoglobinemia, hemoglobinuria dan anemia, diikuti dengan demam tinggi, ikterus dan kegagalan ginjal. Urine secara makroskopis berwarna hitam atau coklat tua. Primaquine dan Chloroquine dapat menyebabkan hemolisis pada penderita defisiensi enzim G-6-PD (glucose-6-phosphate-dehydrogenase) (Cheesbrough, 1987).

Tabel di bawah telah di susun oleh tim ahli WHO sebagai patokan guna penanganan penderita (Warrell, *et al.*, 1990).

Tabel 2.1 Komplikasi dan manifestasi malaria falciparum berat.

Kriteria pasti malaria berat.

- 1 Malaria serebral (koma).
- 2 Anaemia normositik berat.
- 3 Gagal ginjal.
- 4 Edema paru.
- 5 Hipoglikemia.
- 6 Syok.
- 7 Perdarahan spontan dan DIC (*disseminated intravascular coagulation*)
- 8 Konvulsi berulang.
- 9 Hemoglobinuria (tanpa sebab lain)
- 10 Asidemia/asidosis laktat

Penjelasan lebih lanjut kriteria gejala klinik malaria dari WHO tersebut adalah:

1. Malaria serebral : koma tanpa sebab lain.
2. Anemia berat : normositik dengan hematokrit $<15\%$ atau Hb <5 gram %.
3. Gagal ginjal : produksi urine <400 ml per hari untuk dewasa dan 12 ml per hari untuk anak..
4. Edema paru atau ARDS (*adult respiratory distress syndrome*).
5. Hipoglikemia: glukosa darah $<2,2$ mmol atau 40 mg persen.
6. Gagal sirkulasi/syok : tekanan sistolik <70 mm Hg pada orang dewasa dan <50 mm Hg pada anak..
7. Perdarahan spontan dan tanda-tanda DIC (*disseminated intravascular coagulation*).
8. Konvulsi berulang : $>$ dua kali per 24 jam.
9. Asidosis: bikarbonat darah <15 mmol/liter atau pH $<7,25$.
10. Hemoglobinuria makroskopis.

Suatu kasus dianggap malaria berat bila ditemukan salah satu dari kriteria di atas bersama dengan sediaan hapus yang positif.

Di daerah lain, gejala-gejala berikut di masukkan sebagai kriteria malaria berat :

1. Gangguan kesadaran lebih ringan dari pada koma.
2. Penderita sangat lemah hingga tidak mampu duduk dan berjalan tanpa kelainan nerologis jelas.
3. Hiperparasitemia : $>5\%$.
4. Ikterus : visual atau laboratoris >50 umol atau 3 mg%.
5. Hiperpireksia : $>40^{\circ}$ C.

2.3 Patologi dan Patofisiologi Malaria.

Gejala malaria berhubungan erat dengan stadium aseksual di dalam darah dan efek stimulasinya terhadap makrofag (Pasvol, *et al.*, 1995; Warrell, *et al.*, 1990; White, 1998). Bila diamati, parasit malaria memang hanya menginfeksi sel darah merah saja, tetapi ternyata menimbulkan kelainan patologi dan gejala-gejala yang meliputi berbagai organ.

Hal yang dikemukakan di atas menimbulkan pertanyaan, bagaimana terjadinya kelainan dan gejala tersebut, dan faktor apa yang berperan di sana.

Pada mulanya, ada anggapan bahwa proses patologi atau kelainan organ pada malaria hanyalah merupakan akibat obstruksi pembuluh darah yang disebabkan penimbunan sel darah merah terinfeksi pada pembuluh darah di dalam organ yang terlibat, yang disebut proses sekuestrasi pada infeksi *P. falciparum*. Proses ini diperkirakan terjadi karena sel darah merah terinfeksi membengkak dan tidak elastis atau kehilangan deformitasnya dan tidak mudah menerobos pembuluh darah kecil sehingga akhirnya terperangkap di situ, bertimbun dan menyumbat pembuluh tersebut. Tetapi keterangan ini ternyata tidak seluruhnya benar. Karena sekuestrasi sel darah merah terinfeksi ternyata dimulai bukan pada pembuluh darah dengan diameter terkecil (misalnya pada bagian pertama / proksimal kapiler), tetapi dalam *postcapillary venules* (Howard, 1988; Howard, *et al.*, 1990; Warrell, *et al.*, 1990).

Jadi harus ada faktor lain disamping hanya faktor mekanis.

Demikian juga mengenai gejala anemia. Derajat anemia yang terjadi sering tidak sesuai dengan tingginya parasitemia. Sehingga alasan bahwa anemia disebabkan oleh

pecahnya eritrosit yang terinfeksi dan konsumsi haemoglobin sebagai makanan parasit saja, tidak benar-benar memuaskan.

2.3.1 Sitokin dan penyakit.

Sitokin, sebagai mediator, mengantarkan pesan dan instruksi dari satu sel ke sel yang lain dan mengatur kerjasama antar sel-sel yang terlibat dalam suatu jejaring sehingga menghasilkan suatu “karya” atau efek yang terkoordinasi dengan baik. Lalu lintas mediator dan respon sel efektor yang dikendalikannya, menjamin terlaksananya suatu respons imun yang efektif untuk memerangi agen-agen infeksi yang merusak, serta menghasilkan suatu proteksi bagi hospes. Namun produksi yang berlebihan dari sitokin-sitokin ini dapat menyebabkan reaksi yang berlebihan juga sehingga tidak hanya menghancurkan agen infeksi, tetapi juga sel-sel dan jaringan disekitarnya dan menyebabkan penyakit yang merugikan hospesnya (Abbas , *et al.*,1994; Roitt, *et al.*, 1996). Hal ini disinyalir juga terjadi pada malaria dan dapat menimbulkan gejala malaria berat (Clark, 1987a; Clark, 1987b). Oleh karena itu, dipertanyakan, apakah sitokin-sitokin ini menguntungkan atautkah merugikan pada malaria (Eling and Kremsner, 1994; Grau and Behr, 1995).

2.3.2 Riwayat penelusuran peran TNF pada malaria.

Sejak Taliafero tahun 1938 menemukan adanya “*crisis form*”, yaitu bentuk nekrotis dari *P. falciparum* di dalam sel darah merah pada sediaan hapusan darah yang berasal dari penderita malaria dalam stadium kritis, para peneliti mulai menengarai dan mencari apa sebenarnya faktor yang berperan pada malaria (Clark, *et*

al., 1981; Jensen, *et al.*, 1983). Mereka memperkirakan ada faktor yang selain dapat membunuh parasit malaria, juga menyebabkan proses patologis pada hospes. Bahan tersebut dinamakan sebagai “*crisis serum factor*” yang kemudian dikenal sebagai TNF.

Gagasan untuk meneliti peran TNF dalam patogenesis malaria tersebut, berdasarkan pengamatan-pengamatan berikut :

1. Gejala malaria menyerupai gejala yang terlihat akibat endotoxaemia di mana TNF menjadi mediator utama dalam timbulnya gejala (Clark, *et al.*, 1981; Grau, *et al.*, 1989b; Abbas, *et al.*, 1991).
2. Suntikan rTNF pada tikus yang menderita malaria dini dapat menyebabkan malarianya menjadi berat seperti pada stadium terminal (Clark, 1987a; Clark, *et al.*, 1989).
3. Penggunaan TNF pada penderita kanker dapat menimbulkan efek samping serupa dengan gejala seperti malaria (Clark, *et al.*, 1989).
4. Ditemukan korelasi, antara malaria serebral dan bentuk malaria berat yang lain dengan kadar TNF yang tinggi di dalam serum penderita (Grau, *et al.*, 1989b; Kwiatkowski, *et al.*, 1990).
5. Suntikan antibodi terhadap TNF- α dapat mencegah timbulnya gejala malaria tanpa mengurangi parasitemia (Clark, 1987a).
6. Makrofag dalam kultur, bila dirangsang dengan parasit malaria, memproduksi TNF (Bate, *et al.*, 1988; Picot, *et al.*, 1990).
7. Secara genetik, ditemukan bahwa tikus dengan variasi (*variant*) homozigot dari gen promotor TNF, yaitu TNF2, di mana terjadi produksi berlebihan dari TNF,

menjadi sangat rentan terhadap malaria serebral. Dan tikus yang tuna-TNF2, sama sekali tidak menunjukkan gejala malaria serebral bila diinfeksi dengan cara sama (McGuire, *et al.*, 1994).

2.3.3 Efek TNF secara umum.

TNF adalah molekul yang mempunyai peran kunci dalam jaring-jaring (network) sitokin pada banyak penyakit infeksi dan peradangan. Sejak 1893, para dokter di Eropa sudah mulai memperhatikan bahwa pada penderita kanker, tumornya akan mengecil kalau dia menderita infeksi berat. Kemudian ternyata molekul yang berperan di sana adalah TNF, yang di produksi oleh penderita pada waktu mengalami infeksi, dan mempunyai daya nekrosis pada tumor (Eigler, *et al.*, 1997; Beutler and Cerami, 1988).

Dari famili TNF, yang terpenting adalah TNF-alpha, yang diproduksi terutama oleh monosit aktif dan makrofag sebagai pra-protein yang kemudian dipecah oleh enzim metaloprotease yaitu *TNF- α converting enzyme (TACE)* menjadi molekul monomer dengan berat molekul 17,5 kDA, dan terdiri dari 76 asam amino (Beutler and Cerami, 1990). Sebagian kecil TNF- α di hasilkan oleh sel endotel, keratinosit, astrosit dan fibroblas (Eigler, *et al.*, 1997).

Selain itu ada TNF-beta, yang diproduksi oleh sel T tipe Th1. Peneliti lain menamakan produk sel T tersebut sebagai *Lymphotoxin*, dan ada yang menyatakan bahwa TNF-beta adalah sitokin lain yang merupakan produk dari makrofag juga (Male, *et al.*, 1987).

Gen penyandi TNF- α terletak pada khromosom 6 di daerah MHC class III, dan gen promoternya terletak 308 nukleotida ke arah proksimal (McGuire, *et al.*, 1994).

TNF- α dapat merangsang produksi PGI-2, PGE-2 dan PAF (Dinarello, 1990).

TNF mempunyai waktu paruh biologis yang sangat pendek : Beutler and Cerami (1990) melaporkan *plasma half-life* TNF hanya 6 menit, sedangkan Selby (disitir dalam Clark, 1989) menyebutkan "*plasma clearance half-life*" sekitar 20 menit. Pada kultur monosit, stimulasi dengan LPS menghasilkan kadar puncak dalam 2 jam dan kembali normal dalam 5 jam (Beutler and Cerami, 1990). Sedang percobaan/uji awal stimulasi dengan antigen malaria pada biakan monosit oleh peneliti, menghasilkan puncak konsentrasi TNF antara 4 sampai 6 jam.

Sebagai sitokin radang, TNF mempunyai banyak kesamaan efek dengan IL-1 dan IL-6, baik efek imunologis maupun non-immunologis. TNF dapat menginduksi produksi IL-1, IL-6, maupun TNF sendiri. Begitu juga sebaliknya dengan IL-1, tetapi IL-6 tidak. Meski TNF dan IL-1 dapat menginduksi efek yang hampir sama, tetapi dosis yang dibutuhkan berbeda, dan melibatkan receptor yang berbeda, jadi sel target bisa berbeda juga. Seringkali sitokin-sitokin ini bekerja secara sinergis.

Sifat yang dapat berbeda dengan IL-1 (Dinarello, 1990):

1. TNF bersifat supresif terhadap sumsum tulang, sedangkan IL-1 malah merupakan ko-faktor dalam aktivasi dari sel-sel induk (*stem cells*).
2. TNF bersifat toksik terhadap beberapa jenis tumor dan menyebabkan lekopenia dan nekrosis jaringan lokal. TNF menginduksi hipotensi dan syok jauh lebih kuat dari IL-1.
3. TNF merangsang metabolisme oksidatif pada netrofil, sedang IL-1 tidak.

4. Tetapi IL-1 merangsang pelepasan histamin dan arilsulfat pada basofil dan eosinofil, sedang TNF tidak.

2.3.4 Data klinis mengenai kenaikan kadar TNF dan sitokin lain pada penderita malaria.

TNF- α . Penelitian di kepulauan Solomon (Butcher, *et al.*, 1990a) menunjukkan kadar TNF yang tinggi pada 13 orang diantara 46 orang dengan malaria positif. Ke 13 orang itu ternyata menunjukkan gejala malaria akut, dan TNF hanya dapat dideteksi dalam waktu singkat, yaitu beberapa jam setelah sizogoni.

Pada penelitian di Gambia ditemukan kadar TNF meningkat pada semua penderita malaria. Dan pada penderita malaria serebral, kenaikan kadar itu dua kali dibandingkan pada malaria tanpa komplikasi, bahkan pada kasus fatal menjadi sepuluh kalinya (Kwiatkowski, *et al.*, 1990). Kenaikan kadar TNF dan korelasinya dengan malaria berat terutama malaria serebral juga dilaporkan Grau (Grau, *et al.*, 1989a, 1989c, 1989d, 1990; Grau, 1992) dan Baptista, *et al.* (1997). Hubungan antara peningkatan kadar TNF dengan gejala tersebut ternyata jauh lebih jelas pada penderita-penderita Eropa yang tidak mempunyai kekebalan dan toleransi terhadap malaria (Kremsner, *et al.*, 1989, 1990). Ini sejalan juga dengan penemuan bahwa penderita yang mempunyai antibodi terhadap antigen malaria ternyata menunjukkan kadar TNF lebih kecil (Butcher, *et al.*, 1990). Hal itu juga dibuktikan pada percobaan imunisasi pada relawan yang dilakukan oleh Harpaz, *et al.* (1992).

IL-1. Ada yang menyatakan IL-1 mempunyai hubungan dengan beratnya penyakit malaria; dan seperti juga TNF, sebagai sitokin radang, IL-1 meningkatkan

ekspresi molekul adesi pada permukaan endotel pada malaria (Grau, *et al.*, 1989c; 1990; Kwiatkowski, *et al.*, 1990). Tetapi pada studi kinetik, Grau, *et al.* (1989b, 1989c) menyatakan tidak memperoleh kurve yang sejalan antara gejala klinik dengan kadar IL-1 sebagaimana yang terlihat pada TNF. Kadar IL-1 menunjukkan angka normal pada waktu penderita malaria masuk rumah sakit dengan gejala malaria akut. Butcher juga melaporkan bahwa dari 44 penderita yang diperiksanya, hanya tujuh yang menunjukkan peningkatan kadar IL-1, dan itupun tidak ada hubungannya dengan gejala malaria (Butcher, *et al.*, 1990). Tidak seperti pada TNF, Curfs, *et al.* (1992) melaporkan bahwa IL-1 dosis rendah dapat melindungi tikus-tikus percobaan dari kematian karena malaria serebral.

IL-6. IL-6, salah satu sitokin radang, menurut Kern, *et al.* (1989) dan Ringwald, *et al.* (1993) juga meningkat pada malaria serebral. Tetapi kenaikan kadar IL-6 yang tinggi juga ditemukan pada penderita malaria non serebral (Grau, 1989b) dan percobaan pemberian antibodi terhadap IL-6 pada binatang percobaan tidak menghindarkan hewan tersebut dari timbulnya gejala malaria serebral (Grau, *et al.*, 1990; Grau, 1992; Grau and Behr, 1995). *In vitro*, stimulasi monosit dengan protein merozoit dapat menghasilkan TNF dan IL-6 (Jakobsen, *et al.* 1993a).

IL-8. IL-8, suatu sitokin radang lain, tidak banyak dilaporkan pada malaria. IL-8 diproduksi atas rangsangan TNF dan IL-1, sehingga dianggap hanya merupakan faktor antara (*intermediate*). Pada uji kinetik, ternyata kadar maksimal ditemukan pada hari ke-14 pasca - paten, ketika pada umumnya parasit sudah tidak ditemukan lagi pada sediaan hapus (Kossodo dan Grau, 1997). Laporan penelitian lain ternyata lebih menunjukkan peran protektif IL-8 dari pada peran patologisnya (Richards, 1997).

IL-10 dan TGF-beta (transforming growth factor-beta). Kedua sitokin anti-radang (anti-inflammatory) ini menurunkan (*downregulate*) produksi TNF dan IFN-gamma (Abbas, 1994). Jumlah mRNA IL-10 dalam limpa dan otak ternyata lebih tinggi pada model hewan yang resisten terhadap malaria, dan netralisasi IL-10 dengan antibodi dapat menginduksi timbulnya gejala malaria serebral (Kossodo, *et al.*, 1997). Ada dugaan bahwa timbulnya malaria serebral disebabkan umpan balik yang tidak memadai dari sitokin IL-10 ini (Ho *et al.*, 1998). Hal ini juga ditengarai pada komplikasi anemia berat (Kurzhaus, *et al.*, 1998). Omer dan Riley (1998) juga menemukan bahwa produksi TGF-beta berbanding terbalik dengan beratnya infeksi malaria pada tikus coba.

2.4 Peran TNF dalam Patogenesis Malaria.

Dalam bab ini akan diuraikan kemungkinan peran TNF dalam timbulnya masing-masing gejala tersebut menurut kepustakaan yang berhasil dikumpulkan.

2.4.1 Demam.

Salah satu gejala penting dan khas dari malaria adalah timbulnya demam yang *intermitent*.

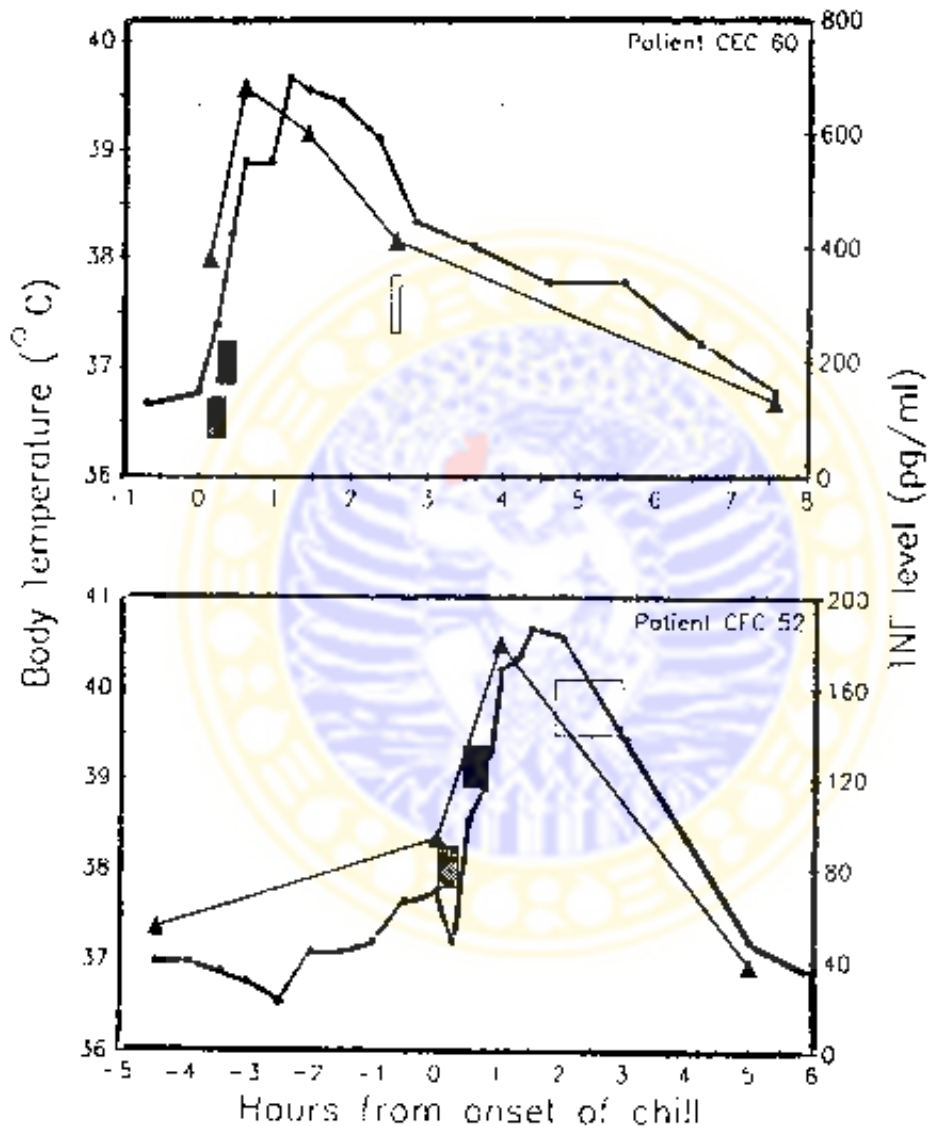
Golgi, sejak lebih dari satu abad yang lalu telah menyatakan bahwa demam paroksismal pada malaria timbul bersamaan dengan pecahnya sizon dari sel darah merah yang dihuninya (Kwiatkowski, *et al.*, 1989; Playfair, *et al.*, 1990; Kwiatkowski, 1995; Kwiatkowski, *et al.*, 1997). Golgi telah menggunakan istilah "*pyrogenic toxin*" untuk produk yang timbul pada saat pecahnya sizon tersebut. Sesudah itu, lama tidak

ada yang mencoba mencari fakta lebih lanjut mengenai demam ini. Kemudian diketahui, bahwa panas ternyata ada hubungannya dengan sitokin-sitokin pirogenik seperti TNF yang disekresi karena rangsangan antigen malaria (Kapas, *et al.*, 1995).

Pada percobaan kultur makrofag bersama *P. falciparum*, disimak bahwa produksi TNF meningkat secara maksimal bersamaan dengan pecahnya sizon. Juga terbukti pada penderita malaria bahwa timbulnya panas terjadi bersamaan dengan lonjakan kadar TNF pada waktu pecahnya sizon (Kwiatkowski, 1989; Kwiatkowski, *et al.*, 1989) dan demam akan menurun bila efek bioaktif TNF dicegah dengan pemberian antibodi monoklonal terhadap TNF (Kwiatkowski, 1997). Grau juga mencatat adanya hubungan kinetik antara kadar TNF dan suhu tubuh (Grau, *et al.*, 1990). Van der Meer, *et al.* (1988), dengan menggunakan metode *radioimmunoassay* menemukan kadar TNF meningkat pada penderita panas karena malaria, dan tidak menemukan peningkatan tersebut pada penderita panas karena penyakit lain.

Butcher, *et al.* (1990) menemukan pada penderita malaria *vivax* di Kep. Solomon, bahwa kadar TNF paling tinggi pada penderita yang mengandung parasit dalam stadium cincin muda (*young ring forms*), ini berarti beberapa saat setelah pecahnya sizon. Berlainan dengan malaria *falciparum*, panas paroksismal pada malaria *vivax* sangat teratur dan bisa di-"ramalkan" (Ho and Sexton, 1995; Karunaweera, *et al.*, 1992b), walaupun kadar TNF bisa sangat bervariasi. Pada 8 dari 9 penderita malaria *vivax* yang diikuti secara periodik, terlihat bahwa dinamika naik-turunnya panas sangat erat hubungannya dengan dinamika dari kadar TNF dalam plasma, dan mengikuti dengan jarak kira-kira 30 sampai 60 menit (Karunaweera, *et al.*, 1992b). Fluktuasi kadar TNF yang diikuti oleh fluktuasi suhu tubuh ini dapat dilihat pada

gambar 2.4. Puncak panas dapat sampai $41,1^{\circ}\text{C}$, yang terjadi 1 sampai 2 jam sesudah permulaan menggigil (Karunaweera, *et al.*, 1992b).



Gambar 2.4 Kurve kadar TNF dalam serum dan tingginya suhu tubuh pada penderita malaria *vivax* (Sumber Karunaweera, *et al.*, 1992b fig.1).

- ▲ — kadar TNF dalam serum
- — suhu tubuh

2.4.2 Anemia.

Anemia merupakan konsekuensi tak terhindarkan dari malaria, terutama pada anak-anak (Melancon-Kaplan, *et al.*, 1993; Pasvol, *et al.*, 1995).

Mekanisme terjadinya anemia pada malaria dapat melalui beberapa cara :

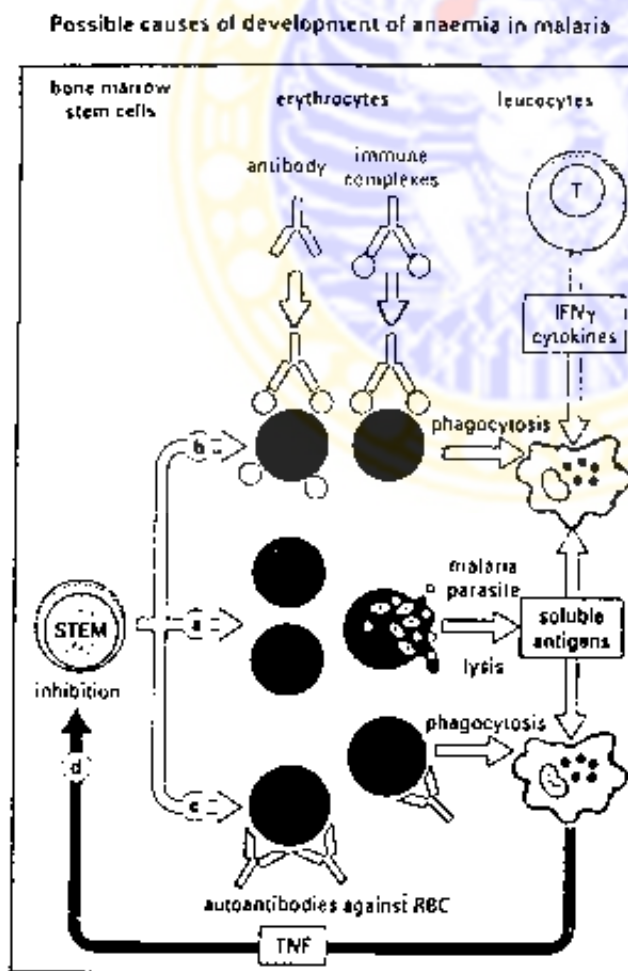
1. Desintegrasi dari sizon menjadi merozoit juga menyebabkan desintegrasi sel darah merah yang menjadi hospesnya.
2. Parasit malaria mengkonsumsi hemoglobin untuk pertumbuhannya dan multiplikasinya (Rosenthal and Meshnick, 1998).
3. Meningkatnya derajat destruksi dan fagositosis sel darah merah di dalam limpa pada malaria (Miller, *et al.*, 1989; Melancon-Kaplan, *et al.*, 1993).

Dengan struktur dan komponen sel yang khas, limpa merupakan organ ideal untuk surveilans dan destruksi bagi eritrosit yang menua dan eritrosit yang mempunyai kelainan. Dan eritrosit hancur akan di fagositir oleh makrofag.

Pada malaria, telah ditemukan data-data berikut :

- 3.1. Sel darah merah terinfeksi sizon dan trofozoit akan melembung dan kehilangan elastisitas dan daya deformabilitas, sehingga mudah terperangkap dalam limpa (Howard, 1988).
- 3.2. Antigen malaria yang terekspresi di permukaan eritrosit menjadikan eritrosit tersebut target yang empuk bagi surveilans imun (Howard, 1988).
- 3.3. Neutrofil dan makrofag mensekresi radikal oksigen, nitrogen oksida dan protease dalam jumlah lebih tinggi, serta melaksanakan kegiatan fagositosis yang lebih tinggi sehingga terjadi penuaan dini dari sel darah merah dan peningkatan destruksi dan eliminasi. Tidak hanya untuk sel

binatang percobaan yang menderita malaria dini menyebabkan terjadinya diseritropoiesis dan peningkatan eritrofagositosis (Clark and Chaudry, 1988b) yang bisa diobati dengan antibodi terhadap TNF tetapi tidak sembuh dengan eritropoietin (Broxmeyer, 1995). TNF men-stimulir produksi radikal oksigen yang merusak sungsum tulang, TNF juga meningkatkan eritrofagositosis dan secara autokrin merangsang diferensiasi sel induk (stem cell) ke arah monosit dengan menggeser sistim eritropoietik (Clark, *et al.*, 1988b; Miller, *et al.*, 1989)



Gambar 2.5

Bagan ringkasan dari penyebab - penyebab anemia yang dibuat oleh Roitt, *et al.* (Roitt, *et al.*, 1996 fig. 18-29), sebagai bahan perbandingan

8. TNF, IL-1, IFN-gamma dan IL-2 meningkatkan ambilan (*uptake*) zat besi ke dalam sel makrofag, meningkatkan ekspresi reseptor transferin dan meningkatkan sintesis feritin dalam sel hepar. Faktor ini juga menyebabkan hipoferemia yang memberatkan anemia pada penyakit khronis seperti malaria (Weiss, Wachter and Fuchs, 1995).
 9. Pada penderita malaria mungkin saja terjadi pemasukan zat besi yang kurang karena adanya anoreksia dan kekurangan gizi, meskipun "*re-feeding*" dapat saja menyebabkan kekambuhan (Murray *et al*, 1975).
 10. Telah dibuktikan oleh Taverne dan kawan-kawan bahwa tikus transgenik dengan sekresi TNF berlebihan akan menderita anemia (Taverne, *et al*, 1994). Dalam survei epidemiologik di antara 175 anak malaria di Afrika, Kurzhals menemukan hubungan kadar TNF dengan anemia berat dan malaria serebral, dan ternyata kadar IL-10 pada anak yang anemis rendah. Diduga bahwa kadar IL-10 yang cukup dapat mencegah timbulnya anemia karena TNF (Kurzhals, *et al*, 1998).
- Berlainan dengan peneliti-peneliti di atas, Rudin dan kawan-kawan (1997a) menyatakan bahwa anemia tidak terlalu berhubungan dengan TNF.

2.4.3 Hemoglobinuria dan Black Water Fever.

Hemoglobinuria merupakan akibat hemolisis yang berlebihan yang disebabkan oleh salah satu proses seperti disebutkan di atas atau sensitisasi sel darah merah karena penggunaan yang sering dari obat Quinine. Pada penderita defisiensi enzim *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*, penggunaan Primaquine dapat memicu hemolisis berat.

Keadaan itu dapat menyebabkan ginjal mengalami nekrosis tubuler akut (Manson and Bahr, 1989).

2.4.4 Malaria serebral.

Malaria serebral selalu dihubungkan dengan proses sekuestrasi dari sel darah merah terinfeksi di dalam pembuluh darah kecil dalam otak (Berendt, *et al.*, 1990, Hommel, 1993). Mengenai malaria serebral ini akan dibicarakan secara panjang lebar, karena mekanismenya dapat dijadikan model untuk memahami patologi yang terjadi di organ-organ lain yang mengalami sekuestrasi juga.

Terdapat perbedaan dalam laporan-laporan yang ada mengenai gambaran patologi. Ternyata sekuestrasi tidak selalu ditemukan pada preparat autopsi (Eling and Kremsner, 1994). Dengan mempelajari patogenesis seperti yang akan diuraikan pada bab ini secara bertahap, akan dapat dipahami adanya perbedaan-perbedaan tersebut.

2.4.4.1 Sel darah merah terinfeksi stadium lanjut dari *P. falciparum* mengalami sekuestrasi di dalam “*post-capillary venules*”.

Pada infeksi dengan *P. falciparum*, sel darah merah terinfeksi sizon dan trofozoit menghilang dari peredaran darah perifer dan mengalami sekuestrasi di dalam pembuluh darah di organ-organ. Pembuluh darah di mana terjadi sekuestrasi pertama adalah vena kecil pasca-kapiler, jadi bukan pembuluh darah dengan diameter terkecil.

Lagi pula, konsentrasi (atau persentasi) sel darah merah terinfeksi parasit di dalam pembuluh darah ini jauh lebih tinggi dari pada di dalam peredaran darah besar. Hal ini dapat dilihat pada gambaran mikrografi kapiler yang terisi dengan sel darah

merah terinfeksi parasit pada gambar 2.6. Dari fakta tersebut, bisa diduga proses sekuestrasi bukan hanya terjadi karena terperangkapnya eritrosit terinfeksi yang menggelembung dan kehilangan elastisitasnya atau kemampuan "*deformability*" yang menyebabkan obstruksi dan kongesti (Howard, 1988; Warrell, *et al.*, 1990).

Ada dua proses yang berperan dalam sekuestrasi, yaitu:

1. *Sitoadherens (cytoadherence)* atau melekatnya sel darah merah terinfeksi parasit malaria kepada endotel pada dinding pembuluh darah (Howard, *et al.*, 1990; Oh, 1997).
2. *Roseting (rosetting)* yaitu melekatnya sel darah merah terinfeksi kepada sel darah merah yang lain (Wahlgren, *et al.*, 1989, 1994, 1995, 1998)

Karena proses sitoadherens, sel darah merah terinfeksi dapat melekat pada dinding pembuluh darah pasca kapiler. Disertai dengan proses roseting sel darah merah dan akumulasi sel-sel darah yang lain seperti netrofil, sel NK, trombosit dan makrofag, serta adesi sel-sel tersebut kepada endotel juga, maka terjadi gerombolan atau gumpalan sel yang besar yang dapat menyumbat pembuluh darah. Oklusi pembuluh darah ini dapat menyebabkan "*petechiae*" (titik-titik perdarahan) dan "*ring hemorrhage*" (perdarahan melingkar) di sekeliling pembuluh darah yang tersumbat.

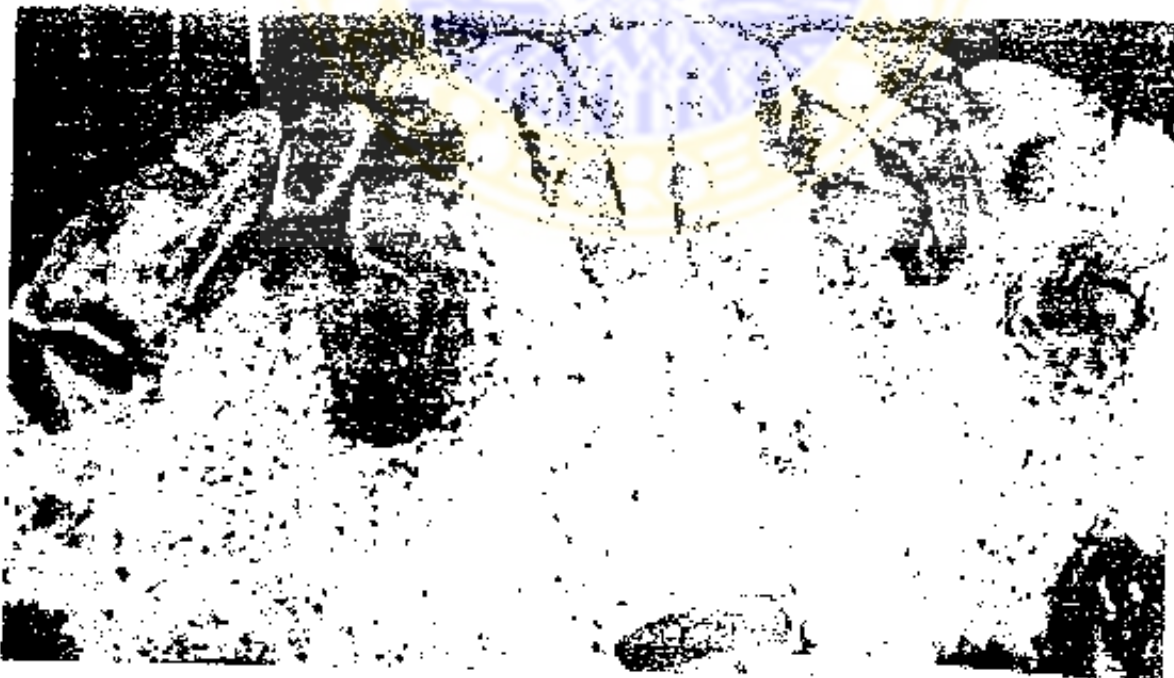
Lihat gambar 2.7.

Tersumbatnya aliran darah menyebabkan gangguan fungsi jaringan setempat.

Saling kontak antara sel-sel darah yang terakumulasi menyebabkan sel-sel tersebut terangsang, ditambah dengan stimulasi antigen malaria yang disekresi oleh parasit yang terperangkap di tempat itu juga, menyebabkan keluarnya bermacam-macam bahan seperti sitokin, eikosanoid, radikal oksigen, nitrogen oksida reaktif dan sebagai-



Gambar 2.6 Elektronmikrografi dari kapiler otak yang dipadati oleh sel darah merah terinfeksi parasit malana. Dikutip dari Gilles and Warrell, 1993 Ch 4 fig 4.1.



Gambar 2.7 Gambaran makroskopis otak penderita malaria serebral dengan bercak-bercak *petechiae*. Dikutip dari Dr. Gabriel Toro, 1980 fig 12 p55.

nya (Eling and Kremsner, 1994). Bahan-bahan tersebut dapat bereaksi lokal dan menambah kerusakan jaringan, tapi juga dapat menyebar melalui sirkulasi darah.

2.4.4.2 Sekuestrasi sel darah merah terinfeksi parasit melibatkan molekul-molekul adesi pada permukaan endotel dan sel darah merah.

Pada proses sitoadherens, sel darah merah terinfeksi melekat kepada permukaan sel endotel pembuluh darah. Molekul-molekul adesi di permukaan endotel yang terlibat antara lain adalah: CD36, trombospondin, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) atau CD54, VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*), *E-selectin* atau ELAM-1 (*endothelial adhesion molecule-1*), dan *chondroitin-4-sulphate* (Esslinger, *et al.*, 1994; Jakobsen, *et al.*, 1994; McGuire, *et al.*, 1996; Prada, *et al.*, 1995; Maubert, Gilbert and Deloron, 1997).

Terdapat bukti adanya aktivasi endotel secara sistemik pada malaria dan molekul-molekul adesi juga meningkat kadarnya dalam plasma, juga pada malaria *vivax* (Jakobsen, *et al.*, 1994; Turner, *et al.*, 1998).

Ligan atau *counter-receptor* pada permukaan sel darah merah adalah: PfEMP1 (*P. falciparum-infected erythrocyte membrane protein 1*), PfHRP1 (*P. falciparum histidine-rich protein 1*), protein band-3; dan ada yang menyatakan RESA/Pf155 dan *glutamate-rich protein* juga dapat bertindak sebagai ligan untuk itu. Molekul-molekul ligan ini, merupakan produk parasit atau protein hospes yang berubah karena infeksi parasit (Anders, *et al.*, 1988; Berendt, 1992; Berendt, *et al.*, 1989, 1990, 1992; Ockenhouse *et al.*, 1991, 1992a, 1992b; Ockenhouse, 1994).

Molekul-molekul adesi ini juga menjadi reseptor bagi sel-sel darah putih. Neutrofil dan makrofag memegang peran dalam fagositosis merozoit, pigmen malaria

dan keping-keping sisa eritrosit dan karenanya dapat ditemukan di lokasi lesi seperti pada malaria serebral (Kumaratilake, *et al.*, 1992; Kwiatkowski, *et al.*, 1989b; Lunel and Druilhe, 1989; Pichyangkul, *et al.*, 1997). Sebagian besar ligan pada permukaan sel darah merah tersebut di atas juga berperan dalam perlekatan sel darah merah terinfeksi dengan sel darah merah normal yang membentuk roset.

Beberapa protein serum juga meningkatkan kemungkinan terjadinya roseting, antara lain fibrinogen, albumin, dan molekul adesi yang terlarut. Daya roseting dari sel darah merah terinfeksi mempunyai hubungan dengan beratnya penyakit. Misalnya, sel darah merah terinfeksi yang mampu membentuk "giant rosette", yaitu roset yang terdiri dari 40-50 eritrosit, ditemukan lebih banyak pada penderita malaria serebral. Sedang sel darah merah abnormal seperti pada talasemia dan anemia sel sabit, kemampuan rosetingnya kecil, dan ini menambah resistensinya kepada malaria (Wahlgren, *et al.*, 1989, 1994, 1998)

2.4.4.3 TNF dan beberapa sitokin lain meningkatkan ekspresi molekul-molekul adesi kepermukaan endotel.

Ekspresi molekul-molekul adesi tersebut di atas kepermukaan sel, selain dirangsang oleh antigen malaria (Graninger, *et al.*, 1994), juga ditingkatkan oleh sitokin TNF dan IL-1, tetapi tidak oleh IL-6, IL-3, dan GM-CSF, meskipun IL-3 meningkatkan daya pengaruh TNF (Berendt, 1992; Berendt, *et al.*, 1989, 1990, 1992; Ockenhouse *et al.*, 1991, 1992a, 1992b; Ockenhouse, 1994; Ringwald, *et al.*, 1993; Wahlgren, *et al.*, 1989, 1994, 1995, 1998; Prada, *et al.*, 1995; Lucas, *et al.*, 1997c). Tikus yang tuna TNF mengalami penurunan ekspresi ICAM-1 dan resisten terhadap malaria serebral (Rudin, *et al.*, 1997a)

TNF dan IL-1 merubah aktivitas antikoagulan menjadi prokoagulan sehingga meningkatkan adesi PMN, monosit dan limfosit pada binatang percobaan (Grau, *et al.*, 1989c). Namun kemampuan rosetingnya sendiri tidak ditingkatkan oleh TNF dan sitokin lain (Ringwald, *et al.*, 1993). IFN- γ juga dapat menginduksi ICAM-1, dan hewan yang tuna sel T tidak mengalami sekuestrasi (Berendt, 1992a).

2.4.4.4 Predileksi organ dan keuntungan parasit dengan sekuestrasi.

Terdapat perbedaan kemampuan sekuestrasi diantara isolat-isolat *P. falciparum* serta predileksi pada organ tertentu. Dapat di otak, jantung, usus, paru, hati, otot. Serupa dengan "homing" dari limfosit pada respon imun, mungkin ada tropisme terhadap jaringan khusus bagi setiap subpopulasi plasmodium.

Dan mungkin juga ada perbedaan derajat ekspresi molekul adesi untuk organ yang berbeda (Berendt, 1992a; Grau, *et al.*, 1990).

Dengan terjadinya sekuestrasi diorgan-organ di luar limpa ini, parasit malaria mendapatkan beberapa keuntungan (Berendt, 1992a) :

1. Dapat menghindari pasasi lewat limpa di mana terjadi proses destruksi dan eliminasi sel darah merah terinfeksi.
2. Lebih mudah memperoleh bahan yang diperlukan, antara lain nutrien dan tekanan oksigen yang pas untuk pertumbuhannya.
3. Lebih mudah memperoleh sel darah merah untuk menjadi hospes baru bagi generasi berikutnya dalam kerumunan sel-sel tersebut.
4. Di dalam roset yang terbentuk, parasit dapat menyembunyikan diri dari mekanisme pertahanan hospes (Wahlgren 1994).

2.4.4.5 Keterlibatan TNF dalam timbulnya malaria serebral diperkirakan melalui mekanisme berikut (Grau, *et al.*, 1989b; Hommel, 1993) :

1. Peningkatan (*upregulation*) dari ekspresi molekul adesi pada permukaan endotel pembuluh darah sehingga terjadi proses sekuestrasi seperti telah diuraikan di atas.
2. Menginduksi timbulnya hipoglikemia, asidosis laktat dan perubahan metabolisme lain.
3. Memicu kaskade sitokin sehingga pada akhirnya menghasilkan radikal oksigen dan proses peradangan yang lain di daerah otak yang terlibat.

Sedang urutan kejadian yang menyangkut peran TNF pada malaria serebral, dengan menggabungkan data dari berbagai rujukan dapat disusun urutan sebagai berikut :

1. Beradanya parasit aseksual dalam sirkulasi darah merangsang makrofag dan membuat hospes sensitif terhadap toxin malaria maupun terhadap TNF (Clark, 1988a). Bahan yang berasal dari sel darah merah terinfeksi menginduksi makrofag untuk memproduksi TNF, yang kemudian dapat berlebihan dengan adanya proses amplifikasi yang akan diuraikan kemudian.
2. Terjadi ekspresi molekul-molekul adesi ke permukaan endotel karena rangsangan antigen parasit malaria di dalam sirkulasi, dan kadar TNF yang tinggi meningkatkan ekspresi molekul adesi pada sel endotel tersebut.
3. Ekspresi yang cukup dari molekul adesi menyebabkan melekatnya eritrosit terinfeksi dan leukosit kepada endotel pembuluh darah di organ-organ sehingga merintis proses sekuestrasi. Ditambah dengan proses roseting dari eritrosit, terjadi penyumbatan pembuluh darah kecil.

4. Eritrosit terinfeksi sizon yang mengalami sekuestrasi mengeluarkan antigen lebih banyak dan menstimulir produksi TNF. TNF merangsang pembentukan NO oleh makrofag dan sel-sel endotel serta otot polos pembuluh darah (Lancaster, 1992). Dan menurut Ghigo, *et al.* (1995), eritrosit terinfeksi juga memproduksi NO dalam jumlah besar. Hal ini menambah kerusakan dinding pembuluh darah dan terjadi nekrosis hemoragis. Pada tikus, monosit yang mengalami sekuestrasi, melepaskan lebih banyak TNF atau mediator lain (Grau, *et al.*, 1989b).
5. TNF mempunyai sifat autokrin, sehingga dapat meningkatkan produksi TNF lokal (Farrar and Schreiber, 1993).

2.4.4.6 Sel T CD4+ diperlukan dalam timbulnya gejala malaria serebral dan komplikasi malaria yang lain.

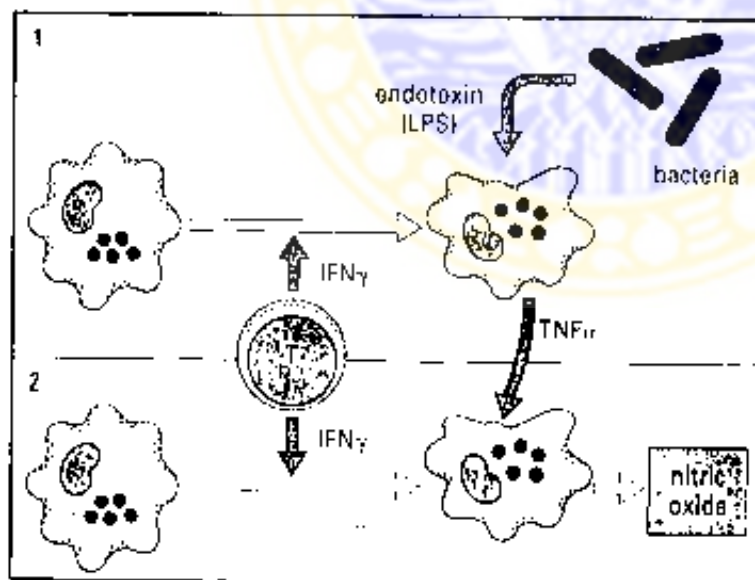
Sudah lebih dari satu dasa warsa diketahui bahwa timbulnya gejala malaria berat memerlukan peran sistim imun yang matang, terutama *cell-mediated immune response* (Clark 1987a, 1987b; Clark, Hunt and Cowden, 1987; Grau, *et al.*, 1987), yang kemudian ternyata lebih terpusat kepada sel T CD4+. Percobaan menyatakan bahwa tikus yang atimik tidak menunjukkan gejala malaria serebral, demikian juga tikus yang diberi antibodi terhadap sel T CD4+ (Grau, *et al.*, 1990, Hermsen, *et al.*, 1997b). Juga dibuktikan bahwa penyuntikan antibodi terhadap sitokin-sitokin yang diproduksi oleh sel T tersebut, yaitu IL-3, GM-CSF dan IFN- γ , dapat menghindarkan tikus dari gejala malaria serebral (Grau, *et al.*, 1988, 1989a).

Analisis kemudian lebih diarahkan kepada IFN-gamma sebagai mediator yang berperan di sini. Rudin, *et al.* (1997b) juga menyatakan bahwa IFN- γ mutlak diperlukan dalam timbulnya gejala malaria serebral. IFN- γ yang disintesis oleh sel

Th1 mengaktifkan sel-sel monosit dan merangsang sel-sel tersebut untuk mensintesis lebih banyak TNF (Grau, *et al.*, 1989a; Farrar and Schreiber, 1993; Taylor-Robinson, 1995; Riley, 1999). IFN- γ meningkatkan transkripsi gen yang mengkode TNF (bisa dilihat dengan meningkatnya jumlah TNF mRNA dalam sitosol) dan membuatnya lebih stabil dengan menghambat represor (Farrar and Schreiber, 1993).

Pada infeksi primer, IFN- γ juga diproduksi, tapi dalam jumlah kecil, oleh sel-sel NK dibawah rangsangan IL-12 yang diproduksi oleh mackofag. Sedang pada infeksi kemudian, IFN- γ diproduksi oleh sel T $\alpha\beta$ dan $\gamma\delta$ (Rhee, *et al.*, 1998; Riley, 1999).

IFN- γ , sinergistik dengan TNF dan antigen malaria sendiri, merangsang produksi NO seperti telah diuraikan di atas (Kremsner, *et al.*, 1993a, 1993b; Ghigo, *et al.*, 1993,



Gambar 2.8
Peran TNF- α
dan IFN- γ pada
endotoksemia.
Dikutip dari
Roitt, 1994
fig 9.16.

Clark and Cowden, 1999). Peran TNF dan IFN- γ pada malaria ini dapat disejajarkan dengan perannya pada endotoksemia seperti pada gambar 2.8.

Pada penelitian klinis, IFN- γ tidak selalu ditemukan dalam serum penderita malaria serebral (Baptista *et al.*, 1997, Butcher, *et al.*, 1990; Clark and Cowden, 1999). Ini menunjukkan bahwa peran produksi sitokin lokal di otak lebih penting dari pada kadarnya secara sistemik.

2.4.4.7 Peran Nitrogen Oksida pada timbulnya gejala koma dan gangguan fungsi otak pada malaria serebral.

NO (*Nitric oxide*) yang diproduksi oleh berbagai sel yaitu endotel, otot polos, neuron, sel hati, monosit/macrofag, mempunyai banyak fungsi fisiologis di dalam tubuh (Lancaster, 1992). Pada keadaan infeksi, NO dimanfaatkan sebagai antimikroba (Nathan and Gabay, 1992), seperti juga yang terjadi pada malaria (Wozencraft, *et al.*, 1984; Rockett, *et al.*, 1991, 1992; Rockett, Clark and Cowden, 1992).

Di otak, NO diproduksi secara konstitutif oleh neuron dan bertindak dalam neurotransmisi sebagai "*postsynaptic retrograde messenger*". Karena pada malaria terjadi sekuestrasi dan produksi mediator-mediator meningkat, termasuk NO, Clark, *et al.* (1991) berteori bahwa NO-lah yang berperan dalam timbulnya gangguan fungsi saraf pada malaria serebral. Adanya produksi yang berlebihan dari NO ekstraneuronal mengacaukan fisiologi penghantaran berita karena sel otak menjadi refrakter. Dan karena NO juga menyebabkan vasodilatasi (lihat uraian di bawah), maka otak juga mengalami kongesti. Hal ini sesuai dengan data patologi-anatomis (Polder, *et al.*, 1989; Nauck, 1967). Antigen malaria dapat merangsang produksi NO dari endotel di sekitarnya (Rockett, *et al.*, 1996). Ditambah dengan hasil penemuan Ghigo, *et al.*

(1995) bahwa eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* dapat memproduksi NO sendiri bahkan lebih tinggi dari pada endotel, dan enzim NOS (*nitric oxide synthase*) ditemukan dalam jumlah tinggi dalam lisat sel darah merah terinfeksi. Semua ini memperkuat dugaan Clark. Lebih-lebih lagi karena IFN-gamma, yang mempunyai daya amplifikasi terhadap produksi TNF, juga dapat menstimulir produksi NO pada makrofag (Moncada, *et al.*, 1991; Roitt, 1994; Clark, Cowden and Rockett, 1995; Roitt, *et al.*, 1996).

2.4.5 Gangguan fungsi hati dan ikterus.

Hati seringkali membesar pada malaria akut. Kelainan hati pada malaria disebut sebagai "*malarial hepatitis*" (Clark, Rockett and Cowden, 1992) dan banyak ditemukan pada penderita malaria di Lombok (Gunawan dan Soewignjo, 1991). Faal hati seringkali mengalami gangguan. Terjadi gangguan aliran darah karena sekuestrasi sel darah merah terinfeksi *P. falciparum* dan deposisi pigmen malaria. Terjadi pembengkakan sel dan hiperplasia sel Kupfer serta infiltrasi sel-sel monosit (Clark, *et al.*, 1987c). Dalam penelitian hewan percobaan diketahui bahwa TNF dapat menyebabkan kerusakan pada sel hati tikus (Rockett, *et al.*, 1992). Menurut Lancaster (1992), kerusakan itu terjadi karena TNF menstimulir sel hepar untuk menghasilkan NO dengan bantuan enzim iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) yang memang ditemukan di dalam sel hati. NO yang terbentuk ini menghambat sintesis protein. Sintesis NO juga dapat dipacu oleh IFN- γ (Moncada, *et al.*, 1991) yang seperti diuraikan di atas, juga berperan dalam timbulnya gejala malaria berat. Kerusakan sel hati ini, yang ditunjukkan dengan peningkatan SGPT dan SGOT, dapat dicegah

dan SGOT, dapat dicegah dengan pemberian antibodi terhadap IL-12 (Yoshimoto, 1998). Seperti diketahui, melalui suatu kaskade sitokin, IL-12 merangsang monosit untuk memproduksi IFN-gamma dan TNF. Dan peran IFN- γ dan TNF dalam mengatur produksi NO ini ditekankan lagi oleh Jacobs, Radziah dan Stevenson (1996a), yang menyatakan bahwa keberadaan NO di hati tidak seperti perannya di dalam limpa yang dapat menjadi petunjuk resistensi terhadap parasit malaria (Jacobs, Radziah dan Stevenson, 1995, 1996b).

Kadar bilirubin terikat (*conjugated*) dalam darah merupakan penunjuk adanya gangguan fungsi hati (Warrell *et al.*, 1990). Hemolisis intravaskuler maupun gangguan fungsi hati dapat menyebabkan hiperbilirubinemia. Pada pemeriksaan laboratorium biasanya ditemukan kadar bilirubin direk dan indirek yang meningkat (Isselbacher KJ, 1994).

2.4.6 ARDS (adult respiratory distress syndrome).

Respiratory distress dan gangguan irama napas sering ditemukan pada anak-anak yang meninggal karena malaria (Pasvol, *et al.*, 1995). Terjadi resesi interkostal pada waktu menarik napas, juga asidosis. Distres ini dapat terjadi sebagai kompensasi terhadap asidosis metabolik, karena kenaikan tekanan intrakranial, akibat dari anemia berat, atau karena udem paru yang disertai dengan hipoksemia arterial berat (Ingram, 1994). Parasit malaria ditemukan dalam sediaan hapus dari paru penderita ARDS karena malaria (Pasvol, *et al.*, 1995).

Menurut Clark (1987), edema paru pada malaria lebih disebabkan kerusakan endotel kapiler dari pada peningkatan tekanan intravaskuler. Ini disokong dengan pemeriksaan

histologis. Juga terjadi peningkatan permeabilitas. Pada pemeriksaan histo-patologis, ditemukan agregasi neutrofil yang melapisi dinding pembuluh darah kecil paru. Neutrofil dapat mensekresi radikal oksigen dan enzim lisosome ke daerah sekitar sehingga terjadi kerusakan endotel pembuluh darah. Pendapat tersebut disokong hasil penelitian laboratorium dari Kumaratilake, *et al.*, (1992) bahwa TNF dan IFN- γ menstimulir neutrofil dengan meningkatkan produksi oksigen radikalnya.

Marginasi atau akumulasi dari netrofil di paru menyebabkan penurunan jumlah netrofil di peredaran darah perifer (Clark, 1987; Beutler and Cerami, 1990).

Lucas *et al.* (1997c) dalam preparat hapusan paru dari penderita yang meninggal karena ARDS, menemukan ekspresi yang menyolok dari ICAM-1 pada endotel mikrovaskuler paru serta peningkatan TNFR2. Sedang Lou, *et al.* (1997) menemukan sekuestrasi, adesi dan fusi platelet dengan endotel pembuluh darah paru dan otak dari tikus yang terinfeksi malaria, dan terbukti hal ini karena induksi TNF dan IFN- γ , dan bergantung kepada ekspresi LFA dan ICAM-1.

2.4.7 Kelainan hemostatik dan trombositopenia.

Lou, *et al.*, (1997) menyatakan bahwa platelet memegang peran penting dalam terjadinya kelainan endotel pada pembuluh darah kecil yang terjadi pada malaria. Beberapa peneliti juga melaporkan adanya aktivitas prokoagulan pada hewan percobaan serta meningkatnya aktivitas katabolisme fibrinogen, dan produk-produk degradasi fibrinogen ditemukan dalam darah. Namun pada autopsi kasus fatal malaria serebral pada manusia tidak ditemukan deposisi platelet dan fibrin dalam otak (Warrell

et al., 1990). Philips, *et al.*, (1993) mengumpulkan data adanya perdarahan pada 5% penderita malaria serebral, dan ditemukan juga perubahan beberapa faktor koagulasi.

Trombositopenia yang ditemukan pada malaria *falciparum* dan *vivax*, mungkin disebabkan oleh :

1. Umur platelet yang berkurang.
2. Eliminasi yang meningkat dalam limpa.
3. Produksi yang berkurang dalam sumsum tulang.
4. Sebagai hasil respon imun karena ditemukan antibodi terhadap platelet dari jenis IgG, dan ada korelasi terbalik antara kadar IgG spesifik tersebut dengan hitungan platelet (Melancon-Caplan, *et al* 1993, Warrell, *et al.*, 1990).
5. Terjadi *dysthrombopoiesis* : ada bukti mikroskopis bahwa jumlah megakariosit dan megakarioblas bertambah tetapi bentuknya abnormal (Warrell, *et al.*, 1990).
6. Ada kemungkinan sekuestrasi platelet sehingga jumlahnya di dalam sirkulasi umum berkurang.

Mekanisme yang terjadi pada platelet pada trombositopenia tersebut mungkin hampir sejajar dengan eritrosit pada anemia, meskipun tidak seluruhnya. Ada kemungkinan terjadinya dismielopoiesis pada malaria, yang ditandai dengan pansitopenia pada sediaan darah tepi (Baskoro dan Boediwarsono, 1997). Penyuntikan binatang percobaan dengan TNF akan menyebabkan trombositopenia (Clark, Hunt and Cowden, 1987) TNF dan IL-1 juga menyebabkan aktivitas antikoagulan pada permukaan endotel berubah menjadi prokoagulan (Grau, *et al.*, 1989c)

2.4.8 Gangguan fungsi ginjal.

Menurut Francis dan Warrell (1993), pada malaria *falciparum*, ditemukan glomerulonefritis transien dan dapat sembuh sendiri. Sepertiga dari kasus pada penderita non-imun akan memperlihatkan kelainan biokimiawi, dengan proteinuria dan hematuria mikroskopis. Kadang juga ditemukan hiperselularitas, hipertropi mesangium dan deposisi IgM, IgG dan globulin β -1c pada glomerulus. Ditemukan juga sekuestrasi sel darah merah terinfeksi pada pembuluh darah glomerulus. Sedang menurut Molineux, *et al.* (1995), ditemukan nekrosis tubuler akut pada malaria berat, terutama pada penderita dewasa.

Gejala klinik hipouria berat (<400 ml/hari) menandai kasus malaria berat. Pada umumnya gangguan fungsi ginjal dapat diatasi apabila dilakukan rehidrasi yang baik (Warrell, *et al.*, 1990). Pada kasus yang betul-betul berat, terutama bila komplikasi lain juga ditemukan, kelainan fungsi berupa nekrosis tubuler akut dan nefrosis iskemik dapat menetap. Reduksi perfusi korteks dapat terjadi akibat hipovolemia dan hemokonsentrasi.

Percobaan Rui Mei, Kara and Sinniah (1998) pada tikus memastikan ditemukannya TNF dan IL-10 dalam plasma dan secara lokal juga ditemukan produksi TNF, IL-1, IL-6 kemudian juga GM-CSF dalam ginjal. Kadar IL-10 pada tikus normal lebih tinggi, namun kadarnya menjadi berkurang beberapa hari setelah infeksi. Ditemukan korelasi kuat antara kadar TNF lokal dengan derajat proteinuria. Sedang kadar IL-10, berbanding terbalik dengan keduanya. Jadi disimpulkan oleh Rui Mei dan kawan-kawannya, bahwa ada hubungan nyata antara sitokin dengan patogenesis nefritis pada malaria. Clark and Cowden (1999) juga menyatakan bahwa kenaikan

kadar sitokin dan hipoksia merangsang produksi NO yang dapat memperburuk keadaan ginjal penderita malaria.

2.4.9 Gangguan kardiovaskuler dan syok.

Pada malaria, terjadi vasodilatasi dan resistensi pembuluh darah yang rendah pada peredaran darah sistemik. Tekanan arteria pulmonaris dapat normal atau menurun. Fungsi miokard biasanya normal (Warrell, *et al.*, 1990).

Pada waktu datang ke rumah sakit, biasanya penderita mengalami hipovolemia karena kurangnya masukan cairan dan meningkatnya pengeluaran cairan karena demam, banyak berkeringat, dan kadang muntah dan diare. Hipotensi ortostatik ditemukan pada 53% penderita. Obat-obat antimalaria dapat menambah hipotensi (Warrell, *et al.*, 1990). Status syok atau disebut malaria algid, mengingatkan kita pada keadaan endotoksemia yang terjadi karena infeksi bakteri Gram negatif. Dari laporan yang dikumpulkan Warrell dinyatakan bahwa infeksi bakteri Gram negatif dapat ditemukan pada 10 dari 175 penderita malaria serebral. Infeksi ini disebabkan oleh insersi kateter, vena seksi atau infus, atau pneumonia aspirasi karena muntah. Namun kemungkinan terjadinya endotoksemia ini sekarang tidak dianut lagi, karena di samping jumlah penderita yang mendapat infeksi sekunder cukup kecil, pada penderita ditemukan tes limulus yang negatif yang menyatakan tidak ada endotoksin (Jakobsen, *et al.*, 1995). Kemudian ternyata, bahwa antigen malaria sendiri dapat menginduksi produksi TNF, yang juga merupakan mediator utama dalam terjadinya gejala-gejala pada endotoksemia. TNF dapat merangsang sel-sel endotel menghasilkan nitric oxide, yang juga disebut sebagai "*endothelial derived relaxing factor (EDRF)*". Bahan ini

dapat melawan efek vasokonstriksi otomatis, dan menimbulkan vasodilatasi (Busse, 1992; Clark, 1987a; 1987b; Clark, 1991; Lancaster, 1992). Dan seperti telah dikemukakan sebelumnya, sel darah merah terinfeksi *P. falciparum* mensintesis NO jauh lebih tinggi dari pada sel-sel endotel dan enzim NOS ditemukan dalam jumlah tinggi dalam sel darah merah terinfeksi (Ghigo, *et al.*, 1995).

2.4.10 Hipoglikemia dan asidosis laktat.

Hipoglikemia merupakan kelainan penting pada malaria.

Hipoglikemia dapat merupakan komplikasi serius yang menyebabkan kematian pada anak-anak yang menderita malaria. Anak mengalami hipoglikemia lebih cepat karena mereka mempunyai reserve yang lebih kecil (Warrell, *et al.*, 1990). Pada malaria serebral, hipoglikemia dan asidosis laktat merupakan sebab kematian utama (Molineux, *et al.*, 1989; Warrell, *et al.*, 1990).

Mekanisme terjadinya hipoglikemia diperkirakan antara lain karena :

1. Berkurangnya masukan gula karena penderita kurang makan.
2. Berkurangnya jumlah persediaan glikogen dan terjadinya penurunan gluconeogenesis dalam hati karena turunnya intake glukosa dan kelaparan yang menyebabkan penurunan aliran darah ke hati (Warrell, *et al.*, 1990).
3. Terjadinya hiperinsulinisme karena Quinine atau Quimidine (Warrell, *et al.*, 1990).
4. Konsumsi glukose yang tinggi, baik oleh parasit malaria maupun oleh hospesnya karena metabolisme yang tinggi karena demam dan infeksi (Warrell, *et al.*, 1990).
5. Hasil kerja dari TNF. TNF memang meningkatkan konsumsi glukose pada organ-organ (Clark, *et al.*, 1987c; Grau and Behr, 1995; Lang, 1995). Secara klinis telah

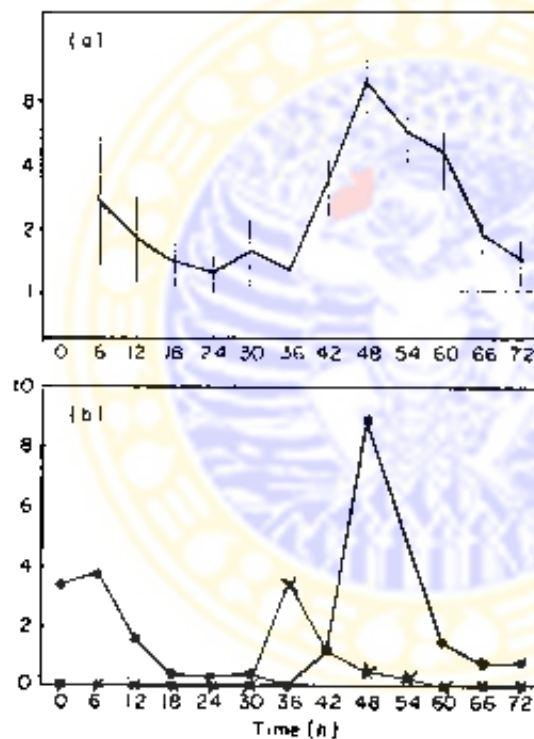
- dibuktikan adanya korelasi antara hipoglikemia dan kadar TNF dan IL-1 pada anak yang menderita malaria (Grau, *et al.*, 1989d; Kwiatkowski, *et al.*, 1990).
6. Antigen malaria dapat menyebabkan hipoglikemia pada binatang percobaan, baik secara langsung atau dengan menstimulir produksi insulin oleh sel-sel beta kelenjar adrenal (Caro, *et al.*, 1996; Jakobsen, *et al.*, 1995; Taverne, *et al.*, 1990; Taylor, *et al.*, 1992). Efek tersebut tidak terjadi pada hewan yang telah diimunisasi dengan antigen malaria (Taverne, *et al.*, 1990).
 7. Laktat dapat terakumulasi bila terjadi glikolisis anerob dan melampaui daya pembersihan (*clearance*) hati. Hipoglikemia dan penimbunan laktat dapat terjadi pada tempat-tempat di mana terjadi sekuestrasi (Jakobsen, *et al.*, 1995)

2.5. Stimulasi dan Hambatan Produksi TNF pada Malaria.

2.5.1 Stimulasi produksi TNF pada monosit oleh antigen parasit malaria.

Picot, *et al.* (1990) mula-mula menemukan bahwa monosit yang dibiakkan bersama dengan sel darah merah terinfeksi parasit malaria akan memfagositir sel darah merah terinfeksi tersebut dan memproduksi bahan yang mempunyai efek sitotoksik yang kemudian dikenal sebagai TNF. Kemudian ternyata antigen - antigen yang dibuat dari produk sel darah merah terinfeksi, juga menunjukkan kemampuan menstimulir produksi TNF pada monosit dalam kultur, yaitu supernatan suspensi sel darah merah tikus yang terinfeksi (Bate, *et al.*, 1988; 1990a,b,c), medium sisa kultur (Taverne, *et al.*, 1990a; 1990b; 1990c), serta sel darah merah terinfeksi yang di-lisis dengan akuades (Bate, *et al.*, 1994a). Kwiatkowski, *et al.* (1989b), dengan mengamati ko-kultur monosit dan parasit malaria, mengidentifikasi saat-saat terjadinya stimulasi

maksimal produksi TNF dihubungkan dengan tahap-tahap dari siklus eritrositik parasit. Ternyata puncak produksi TNF terjadi bertepatan dengan puncak densitas dari bentuk cincin. Berarti stimulasi tertinggi terjadi saat pecahnya sizon dari sel darah merah yang dihuninya, sehingga merozoit dan sisa-sisa eritrosit berada/tersebar di dalam medium. Lihat gambar 2.9.



Gambar 2.9 Produksi TNF dalam ko-kultur monosit dengan sel darah merah terinfeksi *P. falciparum* :

A. kurva kadar TNF dalam supernatan.

B. Kurva kepadatan masing-masing stadium :

☆ = sizon
■ = cincin

Sumber : Kwiatkowski, *et al.*, 1989b fig 3

Jakobsen, *et al.* (1995) menamakan produk-produk parasit yang dapat menstimulir dihasilkannya TNF ini sebagai “toksin” malaria, dan menyamakannya dengan LPS, tetapi aktivitas toksin malaria tidak dapat di-“blok” dengan Polymyxin-B dan menunjukkan reaksi negatif dengan *Limulus amoebocyte lysate*. Lagi pula toksin malaria tidak menggunakan CD14 sebagai reseptor.

2.5.2 Korelasi antara kemampuan antigen menstimulir produksi TNF pada sistim *in vitro* dengan gejala klinik malaria.

Usaha mencari korelasi antara kemampuan menstimulir produksi TNF dari parasit malaria, dengan gejala klinis dan patogenitas yang dilihat pada penderita, menghasilkan data-data sbb.

1. FCR-3, sebuah galur *P. falciparum* yang dikenal *non-virulent* dan tidak mengekspresikan antigen RESA pada permukaan sel darah merah yang dihuninya, menginduksi TNF dalam kadar jauh lebih rendah dari pada SGE-1, galur yang mengekspresikan RESA (Picot, *et al.*, 1993).
2. Galur yang mempunyai daya roseting lebih tinggi mempunyai daya stimulasi TNF lebih tinggi bila dibandingkan dengan strain yang mempunyai daya roseting rendah (Allan, *et al.*, 1993).
3. Isolat parasit yang berasal dari penderita malaria serebral menstimulir TNF lebih tinggi dari pada isolat dari penderita malaria ringan (Allan, *et al.*, 1995).
4. Tetapi galur-galur yang mempunyai “*knob*” (galur yang mempunyai *knob* dianggap lebih mudah mengalami sekuestrasi – Aikawa, 1988), ternyata

mempunyai daya stimulasi produksi TNF tidak berbeda dengan galur yang tidak mempunyai knob (Picot *et al.*, 1990).

5. Menurut Picot, *et al.*, (1990) sel darah merah yang tidak terinfeksi, tidak menstimulir TNF; namun Bate *et al.* (1994b) menyatakan bahwa lisat sel darah merah tidak terinfeksi juga mempunyai daya stimulasi produksi TNF, walaupun dalam derajat yang jauh lebih rendah (lebih kurang 1/200 kali lebih kecil)

2.5.3 Analisis komponen antigen yang menstimulir TNF serta antibodi yang mampu mem "blok"- nya.

Analisis yang dilakukan atas antigen yang dapat menstimulir produksi TNF menghasilkan data sebagai berikut :

1. Selain sel darah merah terinfeksi *Plasmodium* seperti yang telah ditulis di atas, ternyata supernatan atau medium habis pakai dari kultur *P. falciparum* juga mempunyai daya stimulasi produksi TNF. Juga produk-produk terlarut yang diekskresi ke dalam PBS yang digunakan untuk merendam sel darah merah terinfeksi, mempunyai kemampuan yang sama (Bate, *et al.*, 1988, Taverne, *et al.*, 1990b, Taverne, *et al.*, 1990c)
2. Pra-inkubasi monosit dengan IFN- γ meningkatkan produksi TNF (Bate, *et al.*, 1988)
3. Exo-antigen tersebut tahan pemanasan 100 ° C selama 5 menit (*heat stable*) (Bate, *et al.*, 1988, Taverne, *et al.*, 1990b, Taverne, *et al.*, 1990c).

4. Penyuntikan antigen kepada tikus menghasilkan antiserum yang dapat menghambat produksi TNF (Bate, *et al.*, 1988, Taverne, *et al.*, 1990c).
5. Aktivitas inhibisi juga ditemukan di dalam fraksi IgG dari serum tikus hiperimun, yaitu tikus yang diimunisasi dengan lisat dan sembuh dari *challenge infection*. Tetapi antiserum yang dibuat terhadap *exo-antigen* mempunyai kapasitas inhibisi lebih besar dari pada serum dari tikus hiperimun tersebut (Bate, *et al.*, 1990, Taverne, *et al.*, 1990c).
6. Antiserum yang berasal dari tikus yang disuntik dengan *exo-antigen* dari *P. yoelii*, dapat menghalangi induksi TNF oleh *exo-antigen P. falciparum* (Bate 1990), dan antibodi monoklonal yang berasal dari tikus yang disuntik dengan lisat dari sel darah merah terinfeksi *P. falciparum* dapat mengblok stimulasi TNF menggunakan berbagai strain *P. falciparum* (Bate, *et al.*, 1994c). Demikian juga terlihat inhibisi silang antara *P. falciparum* dan *P. vivax* pada penderita (Bate, *et al.*, 1992b; 1994b).

Analisis antibodi/antiserum yang mempunyai daya hambat terhadap antigen yang menstimulir produksi TNF tersebut menghasilkan fakta-fakta sebagai berikut.:

1. Dengan cara kromatografi afinitas, dibuktikan bahwa eluat yang mengandung fraksi IgM mempunyai daya inhibisi lebih besar dari pada fraksi IgG.
2. Bila fraksi IgG di-eliminasi, hambatan (atas produksi TNF) yang dihasilkan, jauh lebih kecil dari pada bila yang di-eliminasi fraksi IgM.
3. Bila percobaan dilakukan pada tikus yang tuna sel T (*T cell deficient*), titer antibodi yang dihasilkan tetap sama.

4. Suntikan ulangan tidak meningkatkan titer antibodi, berarti tidak ada efek "booster".

Dari analisis di atas bisa disimpulkan bahwa antibodi yang terbentuk termasuk isotip IgM, dari golongan "*T-independent*", bersifat "*transient*" atau tidak berlangsung lama, tidak ada efek booster, dan bersifat tidak spesifik terhadap species dan galur tertentu dari *Plasmodium* (terdapat reaksi silang).

Antibodi yang sejenis ternyata juga ditemukan pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* akut (Bate, *et al* 1994a).

Kelompok peneliti lain menemukan substansi lain sebagai komponen aktif yang menstimulir produksi TNF, antara lain :

1. Pigmen malaria, yang merupakan produk metabolisme hemoglobin dan tetap berada di dalam parasit, hanya terbebas bila parasit mengalami sizogoni. Menurut kelompok peneliti ini, bagian non-seluler dari kultur tidak menstimulir produksi TNF (Pichyangkul, *et al.*, 1994, 1997).
2. Molekul glikosil-fosfatidil-inositol (Schofield and Hackett, 1993; Schofield, *et al.*, 1993).
3. RESA (*ring-infected erythrocyte surface antigen*) - (Picot, *et al* 1993).

2.5.4 Coupling fosfolipid dengan protein karier menghasilkan produksi antibodi IgG yang dapat bertahan lebih lama.

Kalau di atas telah diuraikan bahwa antibodi yang dibentuk terhadap antigen yang menstimulir produksi TNF adalah dari fraksi IgM sehingga mempunyai umur singkat, maka Bate beserta kelompoknya (Bate, *et al.*, 1993) berhasil menemukan cara untuk

menghasilkan antibodi tipe IgG dengan cara meng-*coupling* PI (inositol-fosfatidil) kepada protein yang biasa digunakan sebagai protein karier, yaitu KLH (*key-hole lumpet hemocyanine*).

Tiga kali suntikan PI yang dikonjugasikan kepada KLH menghasilkan efek sebagai berikut :

1. Antiserum mempunyai efek bloking 100 kali bila dibandingkan dengan antiserum hasil satu kali suntik.
2. Dapat memperpanjang produksi antibodi dari 30 hari menjadi 60 hari.
3. Mempertinggi titer menjadi 10 kali.
4. Aktivitas bloking berada pada fraksi IgG.

Tikus yang diimunisasi dengan antigen ini menunjukkan perbaikan klinis dan tidak menunjukkan hipoglikemia.

Penemuan Bate ini memberi harapan untuk dapat memperoleh vaksin yang dapat merangsang respon imun lebih lama dan efektif dari pada sekedar respon IgM yang transien.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.

3.1.1 Dari tinjauan pustaka, dapat disarikan hal-hal sebagai berikut :

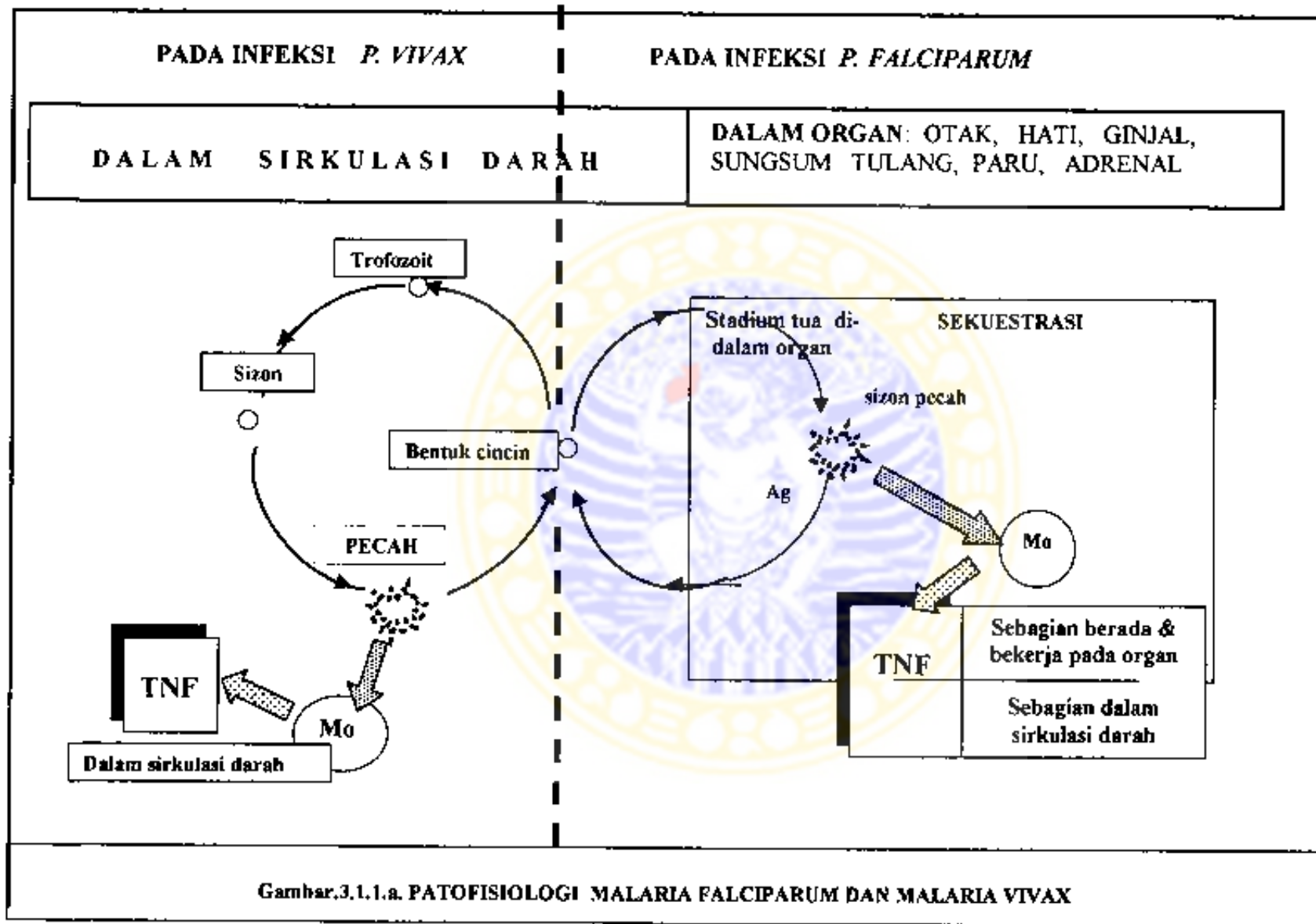
1. Dari hasil temuan di laboratorium maupun di klinik diperkirakan bahwa TNF mempunyai peran dalam terjadinya gejala-gejala klinik malaria, yaitu : demam, anemia, hipoglikemia dan asidosis laktat, malaria serebral, gangguan fungsi hati, edema paru/ARDS (*adult respiratory distress syndrome*), gangguan fungsi ginjal, serta gangguan kardiovaskuler dan syok.
2. Salah satu mekanismenya adalah melalui peningkatan proses sitoadherens dan sekuestrasi sel darah merah terinfeksi parasit stadium lanjut (trofozoit dan sizon) di dalam pembuluh darah kecil di dalam organ, sehingga terjadi proses-proses lokal di situ yang dapat mengganggu fungsi organ yang bersangkutan. Proses sekuestrasi ini terjadi pada infeksi *P. falciparum*.
3. *P. vivax*, dilaporkan tidak mengalami proses sekuestrasi, melainkan tetap beredar di dalam sirkulasi darah. Oleh karena itu proses patologi diperkirakan tidak berhubungan dengan sekuestrasi sel darah merah terinfeksi di dalam organ.
4. Secara *in vitro*, parasit malaria dan produk-produknya dibuktikan dapat menstimulir produksi TNF pada biakan monosit. Produksi TNF ini ternyata *antigen dose - dependent*. Tetapi secara klinik terdapat fakta yang berbeda-

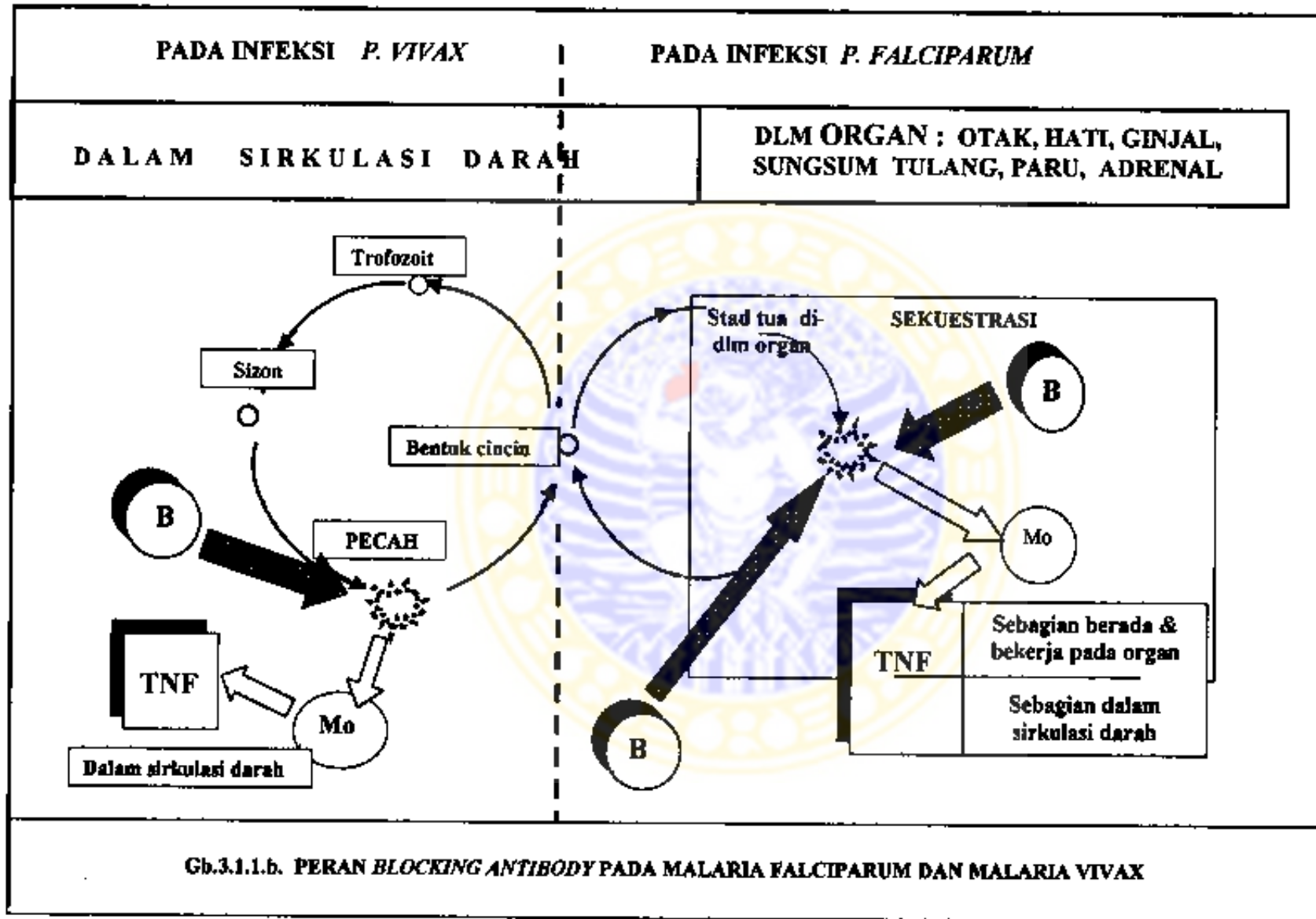
beda tentang hubungan derajat parasitemia dengan beratnya gejala klinik malaria.

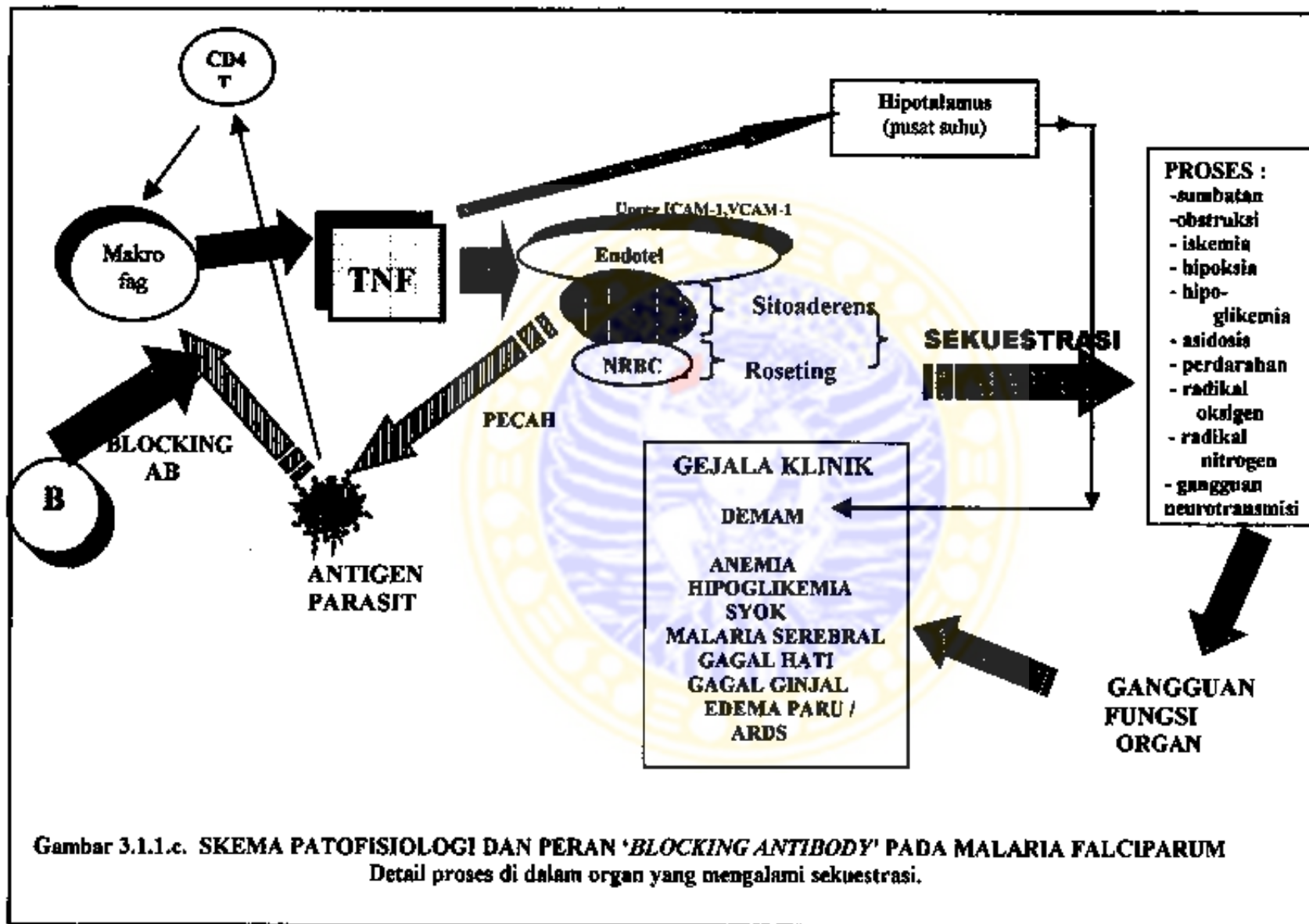
5. Stimulasi produksi TNF pada monosit ternyata dapat dihambat oleh antiserum yang dibuat dengan penyuntikan antigen malaria pada tikus. Ternyata *blocking antibody* ini juga ditemukan di dalam serum penderita malaria akut, dan terdapat reaksi silang di antara berbagai spesies *Plasmodium* dan di antara galur-galur *P. falciparum*.

Dari sari kepustakaan tersebut, dapat direka skema untuk mempermudah pemahaman secara menyeluruh dalam rangka menuju penyusunan kerangka penelitian, yang dalam garis besarnya memuat :

1. Peran TNF dalam patofisiologi timbulnya gejala klinik malaria pada malaria *falciparum* dan malaria *vivax* (gambar 3.1.1.a).
2. Perkiraan peran *blocking antibody* pada malaria *falciparum* dan malaria *vivax* (gambar 3.1.1.b).
3. Penjelasan detail proses patofisiologi yang terjadi pada sekuestrasi dan akibatnya pada penderita malaria *falciparum* , serta perkiraan peran *blocking antibody* di sana (gambar 3.1.1.c).







Gambar 3.1.1.c. SKEMA PATOFISIOLOGI DAN PERAN 'BLOCKING ANTIBODY' PADA MALARIA FALCIPARUM
Detail proses di dalam organ yang mengalami sekuestrasi.

3.1.2 Penyusunan kerangka konseptual penelitian :

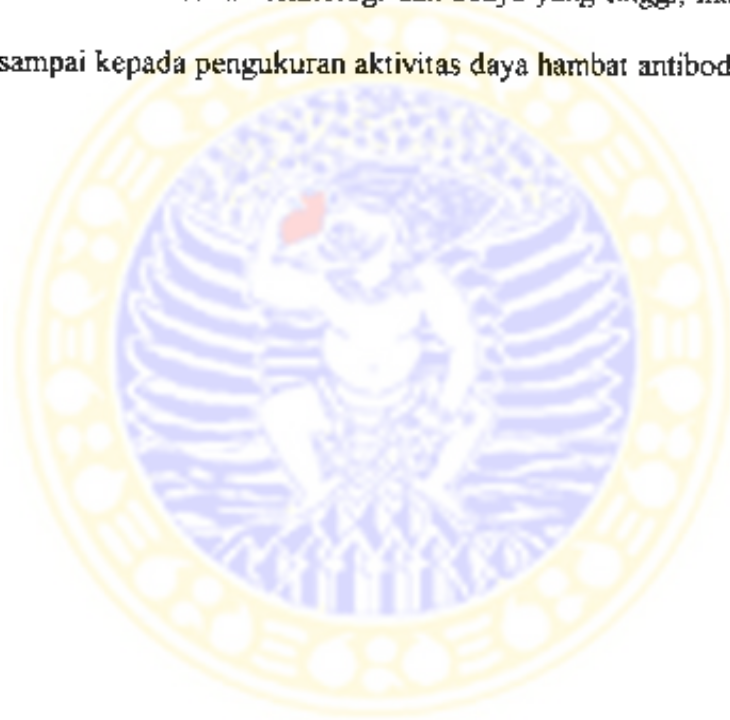
Setelah penelusuran kepustakaan dan penggambaran peran TNF pada patofisiologi malaria serta peran faktor penghambat produksi TNF dalam menurunkan gejala klinik malaria, dapat disusun kerangka konseptual penelitian sebagai berikut :

1. Bentuk dan beratnya penyakit malaria dipengaruhi banyak faktor antara lain faktor spesies dan galur parasit serta kemampuannya dalam menstimulir produksi TNF, respon imun dan kepekaan penderita, serta tingkat endemisitas dan derajat pemaparan.
2. Dengan mengingat bahwa Indonesia terdiri dari berbagai daerah dengan keaneka-ragaman hayati serta tingkat endemisitas malaria yang berbeda-beda, maka perlu diteliti apakah di daerah hipo-mesoendemik Lombok, TNF juga berperan dalam timbulnya gejala malaria.
3. Juga perlu diteliti, apakah di daerah hipo-mesoendemik Lombok, dalam serum-serum penderita malaria ditemukan adanya aktivitas *blocking antibody* yang menghambat produksi TNF, yang juga berperan dalam menurunkan gejala klinik. Diharapkan dapat ditemukan reaksi silang di antara galur-galur *P. falciparum* dari berbagai daerah endemik di Indonesia maupun antara *P. falciparum* dan *P. vivax*.
4. Tetapi adanya perbedaan fisiologi antara *P. falciparum* dan *P. vivax*, yaitu adanya proses sekuestrasi pada *P. falciparum*, yang dapat menyebabkan akumulasi atau tertahannya TNF dan antibodi di dalam organ tempat

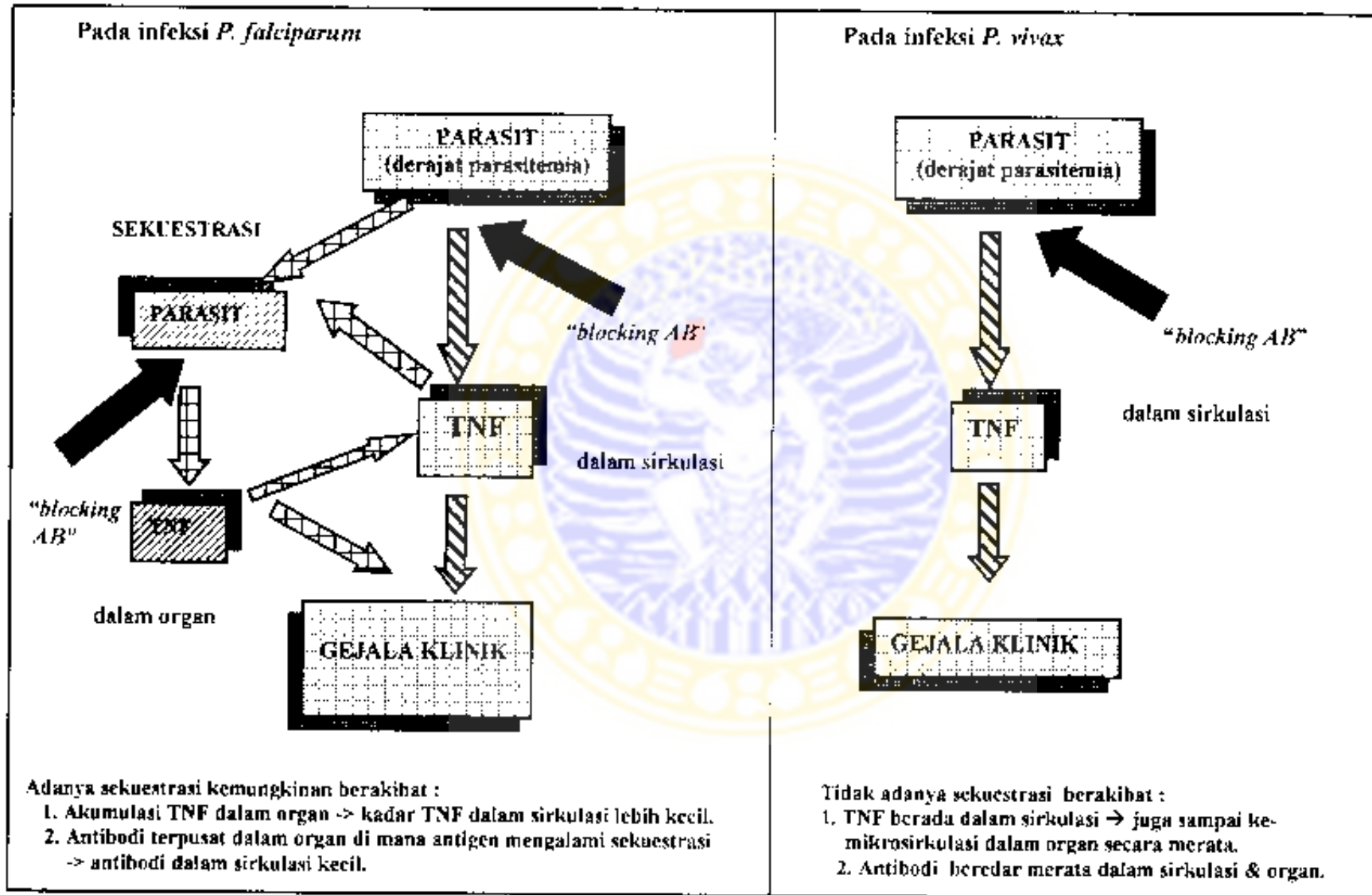
sekuestrasi, maka dapat terjadi perbedaan – perbedaan kadar TNF maupun kadar *blocking antibody* dalam serum penderita kedua macam malaria.

Butir-butir kerangka konseptual itu dituangkan dalam skema pada gambar 3.1.2.

Oleh karena pembuktian adanya *blocking antibody* membutuhkan langkah penelitian lebih lanjut, yang diperkirakan tidak dapat dijangkau dalam penelitian ini karena memerlukan tambahan teknologi dan biaya yang tinggi, maka penelitian akan dibatasi sampai kepada pengukuran aktivitas daya hambat antibodi tersebut .



Skema Kerangka Konseptual Penelitian



3.2 Hipotesis Penelitian :

3.2.1 Hipotesis umum :

TNF berperan dalam timbulnya gejala klinik malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok, dan terdapat faktor yang menghambat produksi TNF dan menurunkan gejala klinik malaria dalam serum penderita-penderita malaria di daerah hipo-mesoendemik tersebut.

3.2.2 Hipotesis kerja :

1. Terdapat korelasi antara derajat parasitemia dengan beratnya gejala klinik pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok
2. Terdapat perbedaan kadar TNF antara penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.
3. Terdapat korelasi antara kadar TNF dengan derajat parasitemia pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.
4. Terdapat korelasi antara kadar TNF dengan beratnya gejala klinik malaria pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.
5. Serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipomesoendemik Lombok menghambat produksi TNF.
6. Terdapat perbedaan besarnya daya hambat produksi TNF di antara serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.
7. Tidak terdapat perbedaan besarnya daya hambat (masing-masing) serum penderita malaria di Lombok terhadap stimulasi produksi TNF oleh antigen dari galur *P. falciparum* yang berasal dari Lombok dan dari Irian Jaya.
8. Terdapat korelasi antara besarnya daya hambat terhadap produksi TNF yang diukur secara *in vitro* dengan penurunan kadar TNF dalam serum penderita, baik penderita malaria *falciparum* maupun malaria *vivax*.

9. Terdapat korelasi antara besarnya daya hambat terhadap produksi TNF dengan penurunan gejala klinik malaria pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipo-mesoendemik Lombok.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.

Untuk menjawab permasalahan dan mencapai tujuan penelitian, digunakan rancangan penelitian korelasional guna menganalisis hubungan antara variabel-variabel yang diteliti dalam suatu penelitian observasional longitudinal (Kerlinger, 1986; Zainuddin, 1992). Alasan memilih rancangan korelasional adalah :

1. Rancangan ini ideal untuk meneliti peran TNF dan menghubungkannya dengan peningkatan atau penurunan derajat parasitemia maupun gejala klinik dalam perjalanan penyakit malaria.
2. Rancangan ini juga sesuai untuk memantau fluktuasi besarnya daya hambat faktor inhibisi dalam serum penderita, yang diperkirakan merupakan antibodi fraksi IgM yang bersifat transien, serta menghubungkannya dengan penurunan gejala klinik malaria.
3. Terjadinya kendala - kendala dalam pelaksanaan penelitian (lihat bab 6) , meniadakan kemungkinan penggunaan rancangan yang lain.

Dalam pelaksanaan pengolahan data, penelitian dibagi menjadi dua bagian, yaitu :

1. Penelitian Bagian Pertama dengan tujuan membuktikan peran TNF dalam timbulnya gejala klinik malaria.

2. **Penelitian Bagian Kedua** dengan tujuan membuktikan bahwa dalam serum penderita ditemukan faktor yang mempunyai daya hambat terhadap produksi TNF dan dapat mengurangi gejala klinik malaria.

4.2 Bagan Alur Penelitian.

Bagan alur penelitian dapat dilihat pada halaman 81, 82, 83

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian.

4.3.1 Populasi penelitian adalah penderita malaria yang dirawat di RSUD Mataram dan Puskesmas Tanjung atau penderita malaria rawat jalan di Puskesmas Tanjung dan Puskesmas Gangga.

4.3.1.1 Kriteria inklusi :

1. Penderita malaria dewasa (umur di atas 15 tahun).
2. Bersedia dilakukan pengambilan spesimen darah beberapa kali berturut-turut.

4.3.1.2 Kriteria eksklusi :

1. Penderita malaria berat dengan keadaan umum jelek.
2. Ditemukannya kemungkinan penyakit lain yang menyertai malaria.

4.3.2 Jumlah sampel:

Digunakan "Tabel penentuan jumlah sampel untuk penggunaan koefisien korelasi r " (lampiran 9 : Appendix 13.C., Hulley and Cummings, 1988) dengan ketentuan-ketentuan sebagai berikut :

- a. koefisien korelasi yang diharapkan $r = 0,78$

Referensi : hasil penelitian Karunaweera *et al.*, (1992) mengenai hubungan antara suhu tubuh penderita malaria *vivax* dengan kadar TNF dalam plasmanya.

b. taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$

karena merupakan sistim biologis

c. tingkat $\beta = 0,20$

maka jumlah sampel yang diperlukan: antara 9 dan 13 penderita malaria.

4.4 Variabel dan Parameter yang Diteliti.

4.4.1 Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah :

1. Jenis parasit dan derajat parasitemia.
2. Berat-ringannya gejala klinik.
3. Tingginya kadar TNF.
4. Tingginya daya hambat serum terhadap stimulasi produksi TNF.

Dalam penggunaan rancangan korelasional untuk mencari keterkaitan antara variabel-variabel, tidak diperlukan identifikasi variabel bebas dan tergantung.

4.4.2. Definisi operasional variabel :

4.4.2.1. Jenis parasit penyebab malaria :

1. *P. falciparum* (F).
2. *P. vivax* (V)

4.4.2.2. Derajat parasitemia atau kepadatan parasit dinyatakan dalam

angka 1 sampai 4, yang berarti (Cheesbrough, 1987):

- 1 = ditemukan 1-10 parasit setiap 100 lapangan pandangan
- 2 = ditemukan 11-100 parasit setiap 100 lapangan pandangan

3 = ditemukan 1-10 parasit setiap satu lapangan pandangan

4 = ditemukan lebih dari 10 parasit setiap lapangan pandangan

4.4.2.3 Gabungan dari butir 4.4.2.1. dan 4.4.2.2. menghasilkan jenis parasit dan derajat parasitemia : F1, F2, F3, F4, V1, V2, V3, V4.

Keterangan : F1 berarti ditemukan *P. falciparum* dengan kepadatan 1-10 parasit dalam setiap 100 lapangan pandangan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. V4 berarti ditemukan *P. vivax* dengan kepadatan lebih dari 10 parasit pada setiap lapangan pandangan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali.

4.4.2.4 Beratnya gejala klinik malaria.

Parameter-parameter gejala klinik dan kriteria gejala malaria berat dapat dilihat pada tabel 4.1.

Dengan memperhatikan kriteria-kriteria pada tabel 4.1, dapat dibuat definisi operasional mengenai malaria ringan dan malaria berat sebagai berikut :

4.4.2.4.1. "Penderita malaria ringan" adalah penderita dengan demam dan sediaan darah positif malaria tanpa komplikasi sehingga tidak dapat dimasukkan dalam kelompok malaria berat.

4.4.2.4.2. "Penderita malaria berat" adalah penderita malaria dengan komplikasi (Warrell, *et al.*, 1990). Komplikasi dapat berupa malaria serebral, kecenderungan perdarahan, hiper-pireksia, syok, hipoglikemia, anemia berat, edema paru, gagal hati, gagal ginjal, dengan kriteria komplikasi seperti yang tercantum pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kriteria gejala dan harga laboratorium dalam hubungan dengan beratnya gejala klinik malaria

Gejala	Gejala Malaria Akut / Gangguan fungsi ringan	Gejala Malaria Berat / komplikasi Malaria
Demam	Suhu 37,2 °C - 40° C	> 40 °C (hyperpyrexia)
Syok	Tensi 70 – 90 mm Hg	Tensi < 70 mm Hg
Anemia (normositik)	Pria : Hb 5 - 14 g% Wanita : Hb 5 - 12 g%	Hb < 5 g%
Faal hati : 1. SGOT 2. SGPT 3. Bilirubin total	20 IU/ml – 50 IU/ml 20 IU/ml – 50 IU/ml 0,9 mg% - 3 mg%	> 50 IU/ml > 50 IU/ml > 3 mg%
Faal ginjal 1. volume urine 2. ureum serum 3. kreatinin serum	>40 mg% >1,8 mg%	< 400 ml/hari
Hipoglikemia :	Glukosa darah 40-65 mg/dl	Glukosa darah < 40 mg/dl
Hiperparasitemia		> 5%
Hemoglobinuria		Makroskopis : urine warna gelap
Kecenderungan perdarahan/DIC (dissemin intravascular coagulation)		Petechiae Rumpel-Leed positif Perdarahan spontan.
Asidosis		Kadar bicarbonat <15 mmol/liter PH darah < 7,25
Edema paru/ARDS		Sesak, gamb.ronsen khas
Konvulsi berulang		2 kali serangan / 24 jam

4.4.2.5. Kadar TNF dalam serum penderita, diukur dengan metode

ELISA - lihat lampiran 3. Dengan menggunakan "kit" tersebut pada lampiran 3, orang sehat pada umumnya menunjukkan kadar TNF <10 pg/ml

4.4.2.6. Daya hambat serum penderita terhadap produksi TNF pada

biakan monosit yang distimulir dengan antigen malaria. Prinsip pengukuran daya hambat serum ini dapat dilihat pada gambar 4.4 dan rincian metodenya dapat dilihat pada lampiran 8. Serum penderita dapat dianggap mempunyai daya hambat terhadap produksi TNF apabila pada percobaan inhibisi, hasil pengukuran kadar TNF pada supernatan lebih kecil dari pada sumur kontrol. Besarnya daya hambat digambarkan dalam persentasi : semakin besar persentasi yang tertulis, semakin besar daya hambat

4.5. Tempat dan Waktu Penelitian.

4.5.1. Tempat pengambilan sampel :

4.5.1.1. Di Bagian Penyakit Dalam Pria dan Penyakit Dalam Wanita, Rumah Sakit Umum Mataram, Kabupaten Lombok Barat

4.5.1.2. Di Puskesmas Tanjung dan Puskesmas Giangga dan daerah sekitarnya, Kabupaten Lombok Barat. Kunjungan rumah di dusun-dusun tempat penderita tinggal atau di tempat kerja penderita di Kab. Lombok Barat – untuk pengambilan sampel *follow up*.

4.5.2. Tempat penelitian laboratorium :

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UNAIR, laboratorium Malaria TDC UNAIR, laboratorium RSUD Mataram dan Unit Riset Biomedik RSUD Mataram, laboratorium *Afd. Infectie Ziekte AZI. Leiden*, dan laboratorium *Medische Microbiologie/ Parasitologie AZN Nijmegen*.

4.5.3. Waktu penelitian :

1. Di RSUD Mataram : dari bulan Januari 1993 sampai dengan Juli 1994 (17 bulan) dan bulan Juni sampai dengan Desember 1995.
2. Di Puskesmas Tanjung dan Puskesmas Gangga dan daerah sekitarnya : dari bulan Nopember 1997 sampai dengan Januari 1998. Pengumpulan sampel di Puskesmas tersebut, yang dilakukan sebanyak 4 kali, masing-masing hanya selama 3-5 hari agar parasit dapat segera dibiakkan di laboratorium.
3. Kultur parasit untuk pembuatan antigen Plasmodium, prosedur laboratorium yang lain serta analisa data, dikerjakan mulai 1992 sampai dengan 2000.

4.5.4 Tenaga peneliti :

Seluruh pekerjaan laboratorium, kecuali pengukuran parameter laboratorium klinik, dikerjakan oleh peneliti sendiri dibantu oleh tenaga dan teknisi terkait.

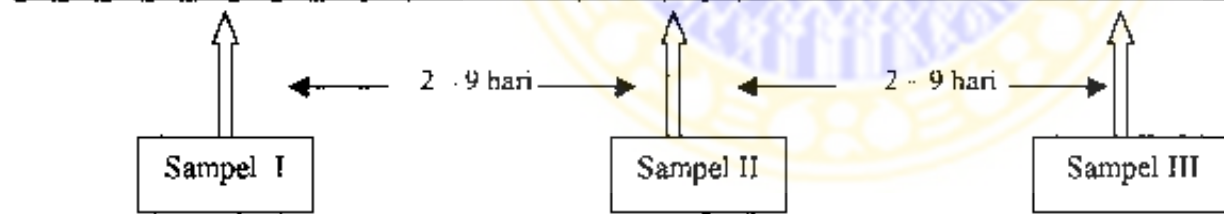
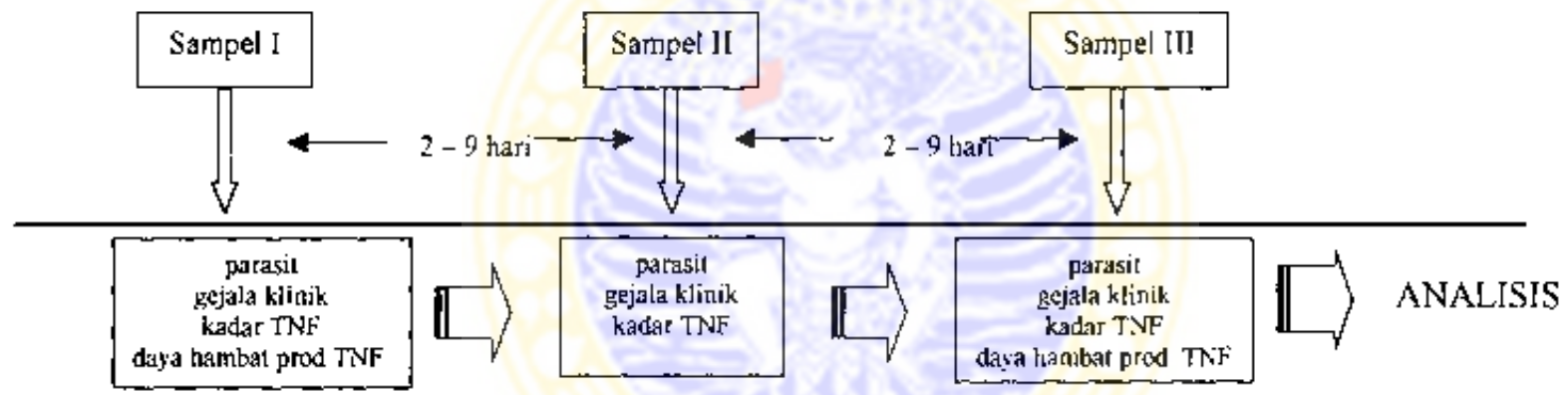
4.6 Alur Penelitian.

Bagan ringkasan alur penelitian dapat dilihat pada 3 halaman berikut.

ALUR PENELITIAN BAGIAN PERTAMA : pada penderita RSU Mataram

- Tujuan .
1. Menentukan korelasi derajat parasitemia dengan gejala klinik malaria.
 2. Menentukan korelasi TNF dengan derajat parasitemia.
 3. Menentukan korelasi TNF dengan gejala klinik malaria.
 4. Membandingkan butir 1,2,3 pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.

Penderita malaria *falciparum*



Penderita malaria *vivax*

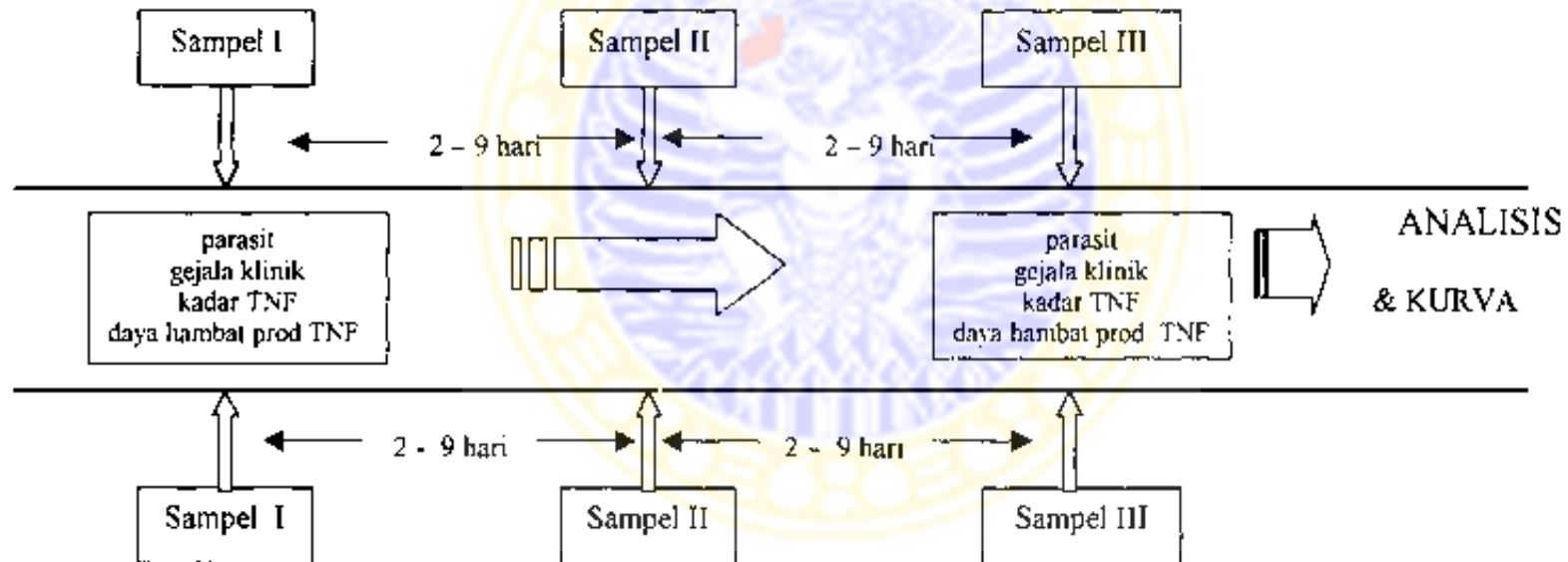
Gambar 4.1. Alur Penelitian Bagian Pertama.

ALUR PENELITIAN BAGIAN KEDUA-1: pada penderita RSU Mataram

Tujuan :

1. Menentukan adanya dan mengukur daya hambat terhadap rangsangan produksi TNF oleh antigen malaria dan mengevaluasi kinetik daya hambat tersebut pada penderita malaria sampai penderita keluar rumah sakit.
2. Membandingkan besarnya daya hambat tersebut pada serum penderita *P. falciparum* dan *P. vivax*.
3. Membandingkan besarnya daya hambat tiap serum terhadap stimulasi antigen dari dua galur berbeda.
4. Menentukan korelasi besarnya daya hambat tersebut dengan penurunan kadar TNF dan penurunan gejala klinik malaria.

Penderita malaria *falciparum*



Penderita malaria *vivax*

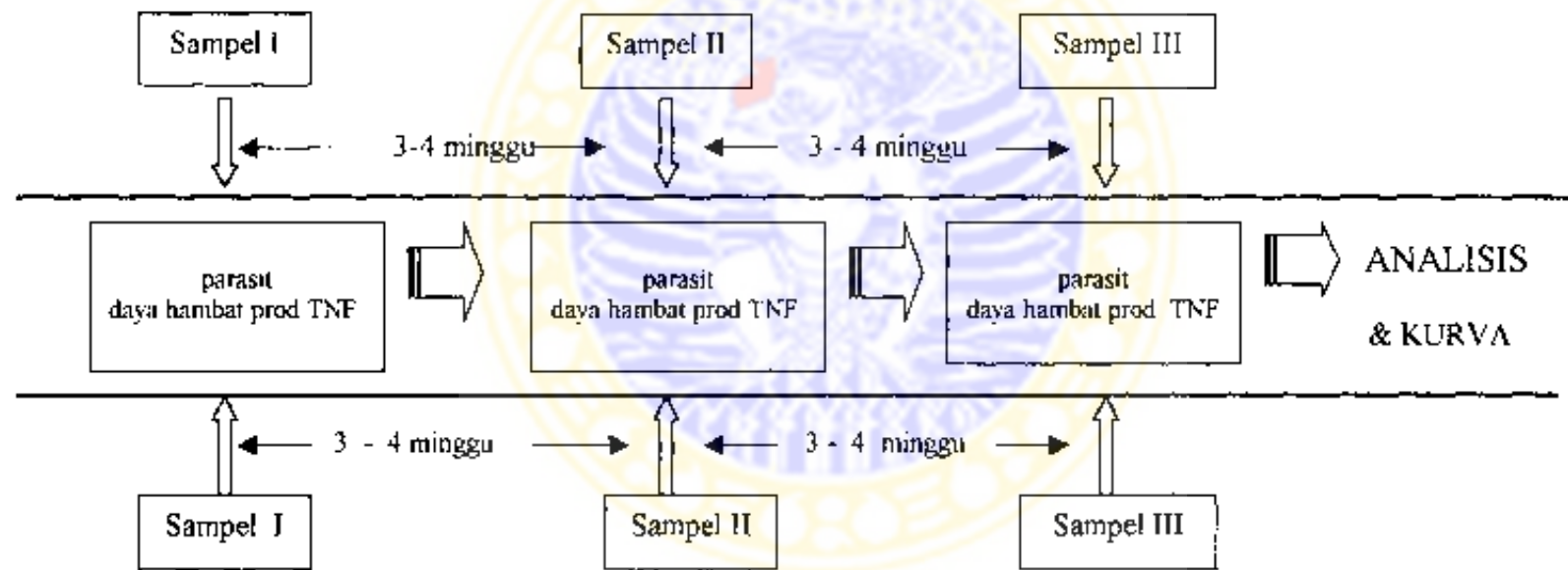
Gambar 4.2 Alur Penelitian Bagian Kedua , kelompok pertama.

ALUR PENELITIAN BAGIAN KEDUA-2: pada penderita Puskesmas

Tujuan :

1. Menentukan adanya dan mengukur daya hambat serum terhadap rangsangan produksi TNF oleh antigen malaria dan mengevaluasi kinetik daya hambat tersebut pada serum penderita malaria sampai masa konvalesen.
2. Membandingkan aktivitas daya hambat tersebut pada serum penderita *P. falciparum* dan *P. vivax*.
3. Membandingkan aktivitas daya hambat serum penderita terhadap stimulasi antigen dari dua galur *P. falciparum*.

Penderita malaria *falciparum*



Penderita malaria *vivax*

Gambar 4.3 Alur Penelitian Bagian Kedua , kelompok kedua.

4.6.1 Tahap persiapan :

1. Persiapan alat - alat besar di laboratorium seperti pengaturan suhu dan kadar CO-2 dari inkubator, daya filtrasi *laminar flow* dan sebagainya. Hal ini perlu dilakukan dalam merintis laboratorium dan sistim yang baru, baik di Surabaya maupun Mataram yang digunakan sebagai transit untuk mempersiapkan transportasi sampel ke Surabaya.

Persiapan dan pengumpulan media, reagen, tabung reaksi, sempit dan sebagainya , dengan memperhatikan ketersediaannya dalam masa krisis moneter.

Pemilihan waktu memilih musim yang tepat untuk dapat memperoleh cukup penderita.

2. Persiapan perijinan dan lokasi penelitian.

4.6.2 Tahap pelaksanaan.

Pengambilan sampel:

- A. Untuk penderita di RSUD Mataram.

A.1. Pengambilan sampel pertama

Dilakukan pada waktu penderita masuk rumah sakit dan sudah diketahui kalau merupakan penderita malaria dan bersedia mengikuti penelitian.

A.1.1. Dilakukan anamnesis mengenai keluhan dan riwayat penyakit:

- i. Perasaan panas-dingin kumat-kumatan.
- ii Nyeri kepala.
- iii. Rasa mual dan mau/sudah muntah

segera dibawa ke Surabaya untuk dibiakkan. Jadi pada sampel dari Puskesmas ini dilakukan :

1. Pembuatan sediaan malaria
2. Pemiakan parasit malaria untuk memperoleh antigen.
3. Pengukuran kadar TNF – yang kemudian ternyata mengalami kendala karena tabung yang digunakan untuk koleksi sampel tidak sesuai.
4. Pengukuran daya hambat serum

Pengambilan sampel dari PKM dilakukan masing-masing tiga kali dengan jarak waktu 3 - 4 minggu.

4.6.3 Pengolahan sampel di laboratorium.

- 4.6.3.1 Diagnosa parasit penyebab malaria dan derajat parasitemia.
- 4.6.3.2 Pengukuran parameter-parameter laboratorium klinik yaitu kadar Hb, jumlah leukosit dan trombosit, fungsi hati dan ginjal.
- 4.6.3.3 Pengukuran kadar TNF dalam serum penderita dengan ELISA – lihat lampiran 3.
- 4.6.3.4 Pengukuran daya hambat serum penderita atas stimulasi produksi TNF pada biakan monosit – lihat gambar 4.4.

Untuk tujuan pengukuran daya hambat ini diperlukan beberapa prosedur, yaitu:

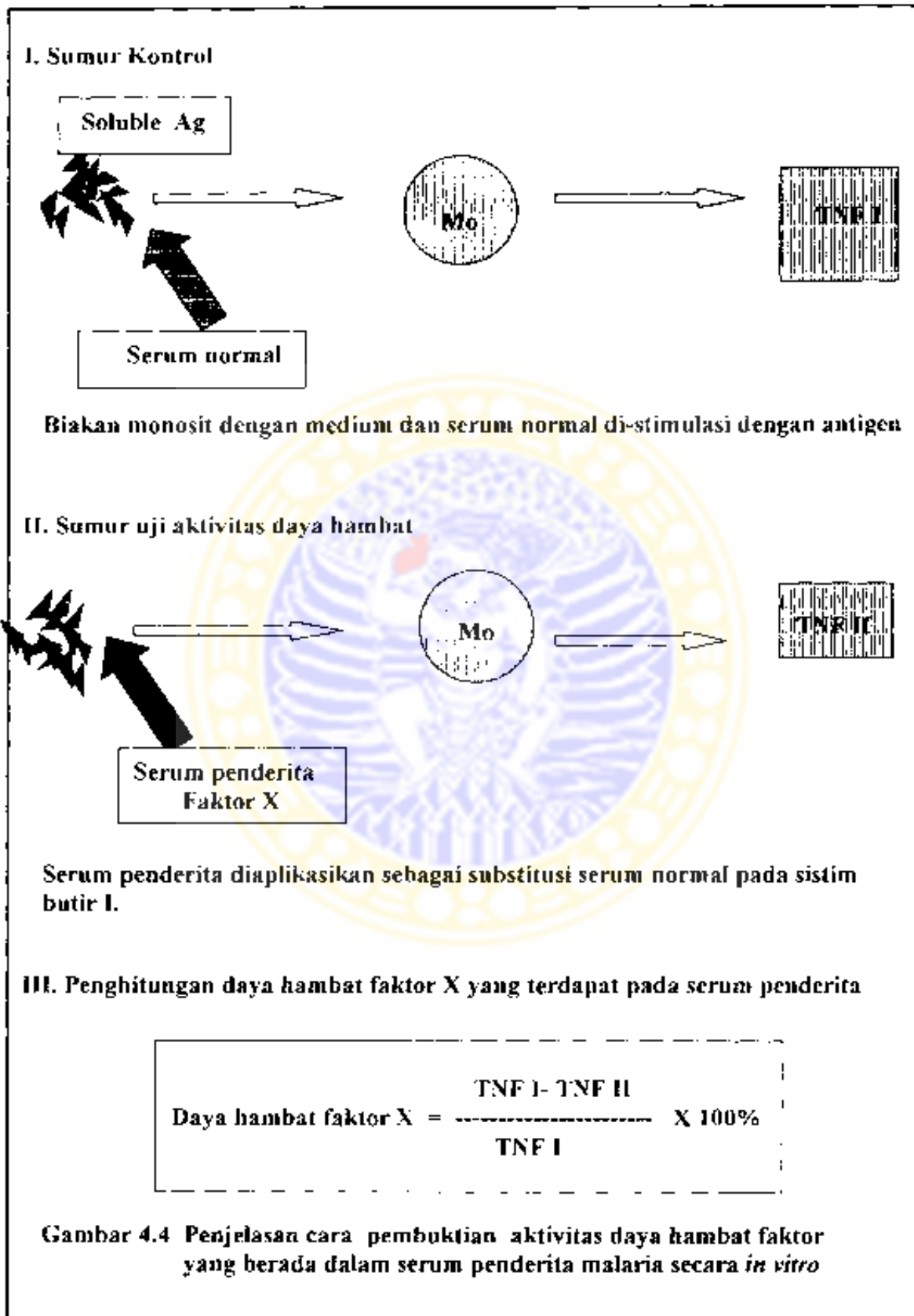
1. Penyediaan biakan sel monosit yang akan di-stimulasi dengan antigen agar memproduksi TNF – lihat lampiran 6.

2. Penyediaan antigen malaria, yaitu sel darah merah terinfeksi *Plasmodium falciparum* stadium sizon yang di-lisis:
 - a. pembiakan parasit malaria untuk memperoleh jumlah bahan yang cukup untuk membuat antigen – lihat lampiran 4.
 - b. pembuatan antigen lihat lampiran 5.
3. Pemisahan dan inaktivasi (dengan pemanasan 54 °C) serum penderita yang akan diukur daya hambatnya.
4. Aplikasi antigen untuk stimulasi produksi TNF pada biakan monosit - lihat lampiran 7
5. Aplikasi serum penderita pada butir 4, kemudian diinkubasi selama 4 jam, lalu dipanen supernatannya, untuk disimpan minus 20 derajat sebelum diperiksa kadar TNF nya.
6. Sistem pengukuran kadar TNF, untuk mengukur kadar TNF dalam supernatan hasil stimulasi-inhibisi produksi TNF pada sistem no 5.
7. Penghitungan daya hambat produksi TNF – lihat lampiran 8.

4.6.3.5 Uji awal

Uji awal (*preliminary assay*) diperlukan untuk menentukan kondisi optimal untuk menghasilkan efek stimulasi-inhibisi yang maksimal, dengan hasil:

1. Jumlah monosit 10^5 per sumur dengan volume seluruh reaktan 200 ul.
2. Pengenceran antigen 1:400.
3. Waktu inkubasi 4 jam.
4. Konsentrasi serum penderita 5% sesuai dengan biakan monosit.



4.7 Analisis Data.

Dalam penelitian yang menggunakan rancangan korelasional ini, uji–uji statistik utama yang dipergunakan adalah uji korelasi Pearson, uji korelasi Spearman rho, dan uji perbandingan harga rata-rata (Munro, Visintainer and Page, 1986; Kerlinger, 1986; Hulley and Cummings, *et al.*, 1988; Siegel, 1992; Zainuddin, 1988; Dajan 1994; Djarwanto 1996; Andi 1997).

Untuk uji–uji statistik ini, dipilih taraf signifikansi 0,05 karena sampel–sampel dan pengukuran–pengukuran yang dilakukan merupakan atau menggunakan sistem biologik sebagai alat pengukur.

Dalam uji korelasi, dapat dipilih penghitungan koefisien korelasi Pearson untuk pengujian hubungan antara dua variabel dengan skala interval atau satu variabel interval dan variabel pasangannya dalam skala ordinal, misalnya hubungan antara hasil–hasil pengukuran kadar TNF, daya hambat serum, derajat parasitemia, pengukuran suhu tubuh, kadar Hb, uji faal hati (SGOT, SGPT, kadar bilirubin total), kadar ureum, kadar kreatinin serum.

Dalam perbandingan harga rata-rata antara dua kelompok data, misalnya harga kadar TNF rata-rata pada penderita malaria berat dan penderita malaria ringan, kedua kelompok data diuji normalitasnya lebih dulu untuk memilih uji yang akan digunakan selanjutnya, apakah uji parametrik atautkah non parametrik.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Pelaksanaan Pengumpulan Sampel dan Pemanfaatannya.

Ternyata target jumlah kasus penderita seperti yang direncanakan, tidak dapat dilaksanakan.

Pada penelitian bagian pertama, untuk mengikuti kadar TNF secara longitudinal, hanya 52 penderita malaria di RSUD Mataram yang memenuhi kriteria penelitian. Penderita-penderita ini rata-rata menjalani rawat inap selama 2 sampai dengan 19 hari. Pada masing-masing penderita telah dilakukan 1 sampai 3 kali pengambilan sampel, dengan jarak waktu masing-masing 2 sampai dengan 9 hari. Pengambilan sampel terakhir dengan jarak waktu terpanjang tercatat 19 hari setelah penderita masuk rumah sakit. Lihat tabel 5.1.

Untuk penelitian bagian kedua, fluktuasi daya hambat produksi TNF dalam serum penderita, pada umumnya diikuti pada minggu pertama, minggu keempat dan minggu ketujuh pada sampel penderita malaria dari Puskesmas Gangga dan Tanjung serta daerah sekitarnya. Tetapi dari 19 penderita yang memenuhi kriteria, hanya 9 orang yang berhasil diperiksa daya hambatnya karena kesulitan teknis.

Untuk penderita RSUD Mataram, fluktuasi daya hambat dapat diikuti dua kali, dengan interval masing-masing 2 sampai 9 hari, dan jarak waktu paling lama 19 hari sebagaimana pada penelitian bagian pertama.

Tabel 5.1 Jumlah sampel yang dapat dikumpulkan dari masing-masing penderita malaria di RSUD Mataram dan Puskesmas Tanjung dan Gangga.

	RSU	Puskesmas
Jumlah seluruh penderita	52 orang	19 orang
Jarak waktu antara dua pengambilan sampel	2 – 9 hari	3 – 4 minggu
Jumlah penderita dengan 1 kali pengambilan sampel	16 orang	1 orang
Jumlah penderita dengan 2 kali pengambilan sampel	26 orang	10 orang
Jumlah penderita dengan 3 kali pengambilan sampel	10 orang	8 orang
Jenis pemeriksaan yang dilaksanakan pada tiap penderita :		
- Pemeriksaan parasitologi	52 orang	19 orang
- Pemeriksaan fisik	52 orang	-
- Pemeriksaan laboratoris klinik	-	-
- Kadar TNF	42 orang	-
- Daya hambat produksi TNF	7 orang	9 orang

5.2 Hasil Penelitian Bagian Pertama.

5.2.1 Distribusi penderita malaria sesuai dengan spesies parasit penyebab

dan derajat parasitemianya.

5.2.1.1 Distribusi spesies parasit malaria dan derajat parasitemia pada penderita RSUD Mataram.

Dari 52 penderita malaria dari RSUD Mataram, ditemukan *P. falciparum* pada 38 (73,1%) orang, *P. vivax* pada 11 (21,1%) orang dan 3 (5,7%) orang sisanya menderita infeksi campuran antara *P. falciparum* dan *P. vivax*. Dari 38 penderita *P. falciparum*

tersebut, 20 orang menunjukkan derajat parasitemia 1, sedang 2 orang menunjukkan derajat parasitemia 2, dan 3 orang dengan derajat parasitemia 3, serta 13 orang mempunyai derajat parasitemia 4.

Distribusi spesies dilengkapi dengan derajat parasitemia dan berat-ringannya penyakit dapat dilihat pada tabel 5.2 dan lampiran 1. Tetapi mengenai beratnya penyakit, akan dibicarakan lebih lanjut pada bab 5.2.2.2.

Tabel 5.2 Distribusi penderita malaria di RSUD Mataram berdasarkan jenis parasit penyebab, derajat parasitemia dan berat-ringannya penyakit.

Jenis parasit		Jumlah penderita		
Spesies	Derajat parasitemia	Total	Gejala klinik	
			Ringan	Berat
<i>P. falciparum</i>	1	20	15	5
	2	2	2	0
	3	3	2	2
	4	13	10	3
		38	28 (73,7%)	10 (26,3%)
<i>P. vivax</i>	1	4	4	0
	2	3	1	2
	3	1	1	0
	4	3	1	2
		11	7 (63,7%)	4 (36,3%)
Infeksi campuran	1	3	3	-
Jumlah seluruhnya		52	38 (73%)	14 (27%)

5.2.1.2 Distribusi spesies parasit malaria pada penderita Puskesmas.

Dari Puskesmas Gangga dan Tanjung serta daerah sekitarnya, dari 19 penderita, ditemukan 15 (78,9%) orang menderita infeksi *P. falciparum* dan 4 (15,8%) orang menderita infeksi *P. vivax*. Pada pengambilan sampel kedua, ketiga dan keempat ternyata 5 penderita mengalami infeksi baru atau super-infeksi. Infeksi tambahan ini semuanya adalah *P. vivax*.

Distribusi spesies dan derajat parasitemia dari penderita malaria dari Puskesmas dan daerah sekitarnya dapat dilihat pada tabel 5.3 dan lampiran 2.

Tabel 5.3 Distribusi penderita malaria dari Puskesmas Gangga dan Tanjung dan sekitarnya berdasarkan jenis parasit penyebab dan derajat parasitemia.

Jenis parasit	Derajat parasitemia	Jumlah penderita
<i>P. falciparum</i>	1	3
	2	4
	3	6
	4	2
	Total	15 (78,9%)
<i>P. vivax</i>	1	2
	3	2
	Total	4 (21,1%)
Jumlah seluruhnya		19

5.2.2 Gejala klinik penderita malaria.

5.2.2.1 Macam dan diskripsi gejala klinik malaria yang berhasil dikumpulkan.

Tabel 5.4 menunjukkan diskripsi hasil pengukuran laboratorium untuk masing masing jenis malaria agar dalam selintas dapat dilihat perbedaan hasil pemeriksaan fisik dan harga-harga laboratorium untuk setiap jenis malaria. Tabel 5.5 menunjukkan frekuensi ditemukannya setiap gejala dan keluhan pada penderita dan penggolongannya dalam gejala klinik malaria ringan atau malaria berat serta persentasinya terhadap seluruh penderita malaria.

Dari tabel 5.4 dan 5.5 ini dapat diketahu, meskipun tampaknya pada penderita malaria *falciparum* pada umumnya gejala klinik lebih nyata, ternyata tidak ada penderita yang mengalami gejala syok, dan hanya satu penderita yang mengalami hipoglikemia ringan (kadar gula darah antara 40-65 mg/L). Oleh karena itu, kedua macam gejala tersebut, dan gejala-gejala lain di mana tidak ada penderita yang masuk dalam kriteria penggolongan malaria berat, tidak dimasukkan ke dalam evaluasi statistik selanjutnya.

Dengan demikian, gejala dapat digolongkan menjadi 5 kelompok yang menyangkut organ/sistim, yaitu:

1. satu gejala yang merupakan data nominal dan hanya ditemukan pada satu penderita yaitu gangguan kesadaran,
2. empat gejala yang merupakan data dengan skala interval/data kontinu :
 - a. demam atau peningkatan suhu

Tabel 5.4 Hasil pengukuran laboratorium klinik pada *P. falciparum* (1), *P. vivax* (2) dan infeksi campuran (3).

Gejala klinik	Spesies 1 = <i>P. falciparum</i> 2 = <i>P. vivax</i> 3 = Mix*	n**	Minimum	Maksimum	Rata-rata	Simpan g Baku
Suhu	1	73	36	40,0	37,3	1,2
	2	20	36	39,4	37,0	1,2
	3	3	37,2	38,3	37,6	0,6
Tekanan darah sistolik	1	73	90	200	113,3	16,2
	2	20	100	120	109,5	7,6
	3	3	100	110	106,7	5,8
Kadar glukose puasa	1	73	60	236	104,9	27,1
	2	20	70	158	99,2	21,3
	3	4	78	112	89,3	16,0
Kadar hemoglobin	1	73	4,2	16,6	11,3	2,6
	2	20	5,1	15,3	11,7	2,2
	3	4	10,6	12,4	11,3	0,8
Jumlah leukosit	1	73	3,9	21,6	7,8	3,4
	2	20	5,9	16,4	7,4	2,3
	3	4	6,3	6,8	6,5	0,3
Jumlah trombosit	1	73	105	311	197,3	29,8
	2	20	127	213	183,8	24,3
	3	4	198	210	201,8	5,6
SGOT	1	73	10	170	29,6	31,6
	2	20	12	45	24,5	10,2
	3	4	8	30	20,0	9,0
SGPT	1	73	6	142	31,4	25,1
	2	20	11	85	32,8	19,7
	3	4	11	27	23,0	8,0
Kadar bilirubin total	1	73	0,24	12,5	1,2	1,9
	2	20	0,2	6,3	1,4	1,5
	3	4	0,65	0,92	0,76	0,12
Kadar ureum darah	1	73	15	513	47,4	90,8
	2	20	15	39	26,5	6,3
	3	4	20	27	23,0	2,9
Kadar kreatinin darah	1	73	0,20	7,50	0,97	1,35
	2	20	0,20	1,30	0,77	0,30
	3	4	0,60	0,80	0,70	0,12

* = Mix adalah infeksi campuran *P. falciparum* dan *P. vivax*

** = n berasal dari "pooled data": dari seluruh sampel (termasuk *follow-up*)

Tabel 5.5 Frekuensi masing-masing gejala klinik pada 52 penderita malaria di RSU Mataram

No	Gejala/keluhan	Jumlah penderita	
		Jumlah	Persentasi
1	Keluhan demam dan menggigit	43	83
2	Keluhan nyeri kepala	33	63
3	Keluhan mual dan muntah	31	60
4	Gangguan kesadaran	1	2
5	Konvulsi berulang	0	
6	Kecenderungan perdarahan	0	
7	Ikterus	12	23
8	Demam ($>37,2^{\circ}$) / hiperpireksia ($>40^{\circ}$ C)*	33 / 2	63 / 4
9	Syok (tekanan darah <70 mm Hg)	0	
10	Tanda-tanda edema paru	0	
11	Anemia (L: 5-14 g%; P: 5-12 g%) / anemia berat (<5 g%)*	41/1	79 / 2
12	Trombositopenia ($<100.000/ml$)	4	8
13	Asidosis (kadar bikarbonat <15 mmol/L.)	Tidak diukur	
14	Hipoglikemia (40-65 mg%)	1	2
15	Peningkatan SGOT ringan (20-50 IU/ml)/berat (>50 IU/ml)*	25 / 5	48 / 2
16	Peningkatan SGPT ringan (20-50 IU/ml)/berat (>50 IU/ml)*	25 / 10	48 / 19
17	Peningkatan kadar bilirubin ringan (0,9-3 mg%)/berat (>3 mg%)*	37 / 7	71 / 13
18	Hemoglobinuria	0	
19	Peningkatan kadar ureum (>40 mg%)	9	17
20	Peningkatan kadar kreatinin ($>1,8$ mg%)	4	8

* = menunjukkan kriteria penggolongan gejala malaria berat untuk komponen gejala tersebut.

- b. anemia atau penurunan kadar hemoglobin
- c. gangguan fungsi hati dengan indikator yang terdiri dari peningkatan SGOT, SGPT, dan kadar bilirubin total
- d. gangguan fungsi ginjal dengan indikator berupa peningkatan kadar ureum dan kreatinin serum.

Ternyata hanya ditemukan paling banyak 4 macam kelainan secara bersama-sama pada setiap penderita. Frekuensi jumlah gangguan sistim yang dialami pada setiap penderita dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Distribusi penderita menurut banyaknya organ/sistim yang terganggu pada penderita malaria di RSUD Mataram.

Jumlah gangguan/gejala yang ditemukan	Jumlah penderita malaria ringan	Jumlah penderita malaria berat	Jumlah
1	4	1	5
2	8	2	10
3	21	2	23
4	5	9	14
Jumlah total	38	14	52

5.2.2.2 Proporsi jumlah penderita malaria ringan dan malaria berat.

Penggolongan menurut berat-ringannya malaria menunjukkan bahwa dari 52 penderita malaria di RSUD Mataram, 38 (73%) orang menunjukkan gejala klinik malaria ringan dan 14 (27%) orang dapat digolongkan penderita malaria berat (lihat tabel 5.2.1.1.). Ternyata gejala malaria berat juga dapat ditemukan pada penderita dengan derajat parasitemia ringan.

Proporsi jumlah malaria berat pada kedua spesies parasit, yaitu 26,3% (10 dari 38 orang) penderita *P. falciparum*, dan 36,4% (4 dari 11 orang) penderita *P. vivax*, ternyata tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna (chi kwadrat : $p = 0,516$). Ini berarti bahwa *P. vivax* juga dapat menyebabkan malaria berat.

Penderita malaria berat secara bermakna menunjukkan gangguan fungsi lebih banyak organ dari pada penderita malaria ringan (chi kwadrat: $p = 0,026$) dapat dilihat pada tabel 5.6 yaitu dari 14 orang penderita malaria berat, 9 penderita menunjukkan gangguan/gejala yang melibatkan 4 organ.

5.2.3 Hasil pengukuran kadar TNF pada penderita dan fluktuasinya.

Dari 52 penderita RSUD Mataram, hanya 42 yang dapat diukur kadar TNF dalam serumnya. Hasil pengukuran kadar TNF dalam serum masing-masing penderita tersebut dapat dilihat pada tabel induk pada lampiran 1.

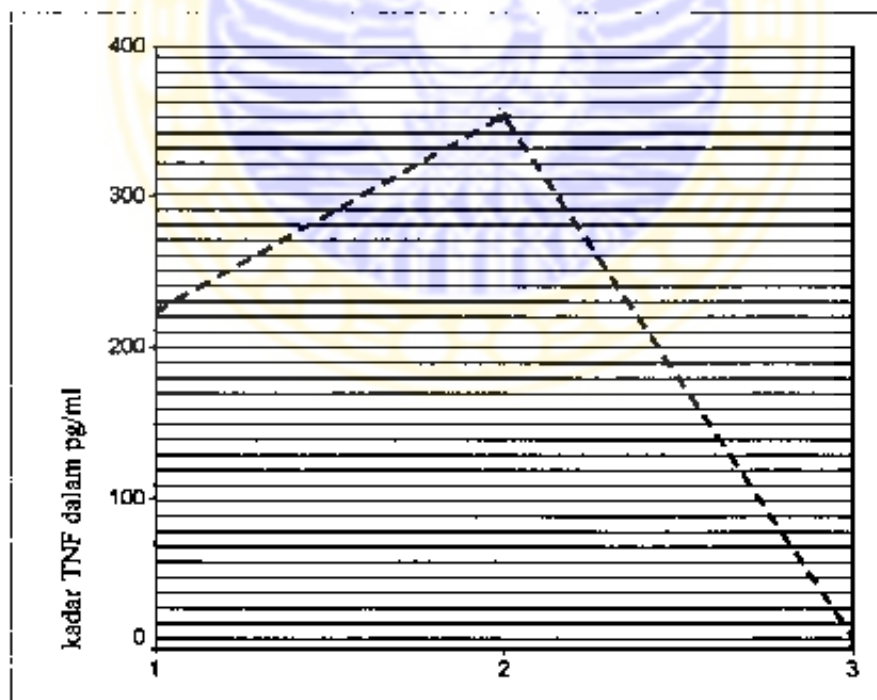
Gambaran kadar TNF rata-rata yang ditunjukkan pada tabel 5.7, menyatakan bahwa TNF pada umumnya dapat dideteksi pada sampel-sampel penderita malaria, dan kadar TNF rata-rata tersebut meningkat pada sampel-sampel kedua (*follow-up* pertama), kemudian menurun drastis pada sampel ketiga (*follow-up* kedua), yaitu pada waktu penderita sembuh, dengan perbedaan yang bermakna terhadap kadar rata-rata TNF sebelumnya (uji t atas perbedaan harga rata-rata pada sampel berpasangan: $p = 0,025$).

Hal ini menunjukkan bahwa kadar TNF dapat diukur pada penderita-penderita malaria, serta dapat terjadi fluktuasi kadar TNF, dan kadar tersebut menurun pada penderita yang sembuh.

Tabel 5.7 Kadar TNF rata-rata dalam serum penderita RSUD Mataram pada sampel-sampel pengambilan pertama, kedua dan ketiga (*follow up*).

Sampel ke	n	Harga TNF rata-rata pg/ml	Uji statistik	
1	42	223,23	GLM untuk sampel ke 1,2 dan 3 p = 0,384	Uji t sampel ke 2 dan ke 3 p = 0,025
2	30	353,44		
3	6	7,53		

Fluktuasi harga rata-rata kadar TNF pada sampel yang diambil secara berturut-turut tersebut ditunjukkan pada gambar 5.1 ini :



Gambar 5.1 Kurva fluktuasi kadar TNF rata-rata pada penderita malaria di RSUD Mataram

5.3 Analisis Hasil Penelitian Bagian Pertama.

5.3.1 Perbandingan kadar TNF pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax*.

Kadar TNF rata-rata pada penderita malaria *falciparum* (309,77 pg/ml +/- 673,18), lebih tinggi secara bermakna ($p = 0,017$) dari pada kadar TNF pada penderita malaria *vivax* (119,02 pg/ml +/- 282,61). Sedang kadar TNF rata-rata untuk infeksi campuran (11,48 +/- 16,65 pg/ml) juga berbeda secara bermakna dari pada malaria *falciparum* ($p = 0,022$). Lihat tabel 5.8.

Tabel 5.8 Kadar rata-rata TNF pada sampel serum penderita malaria *falciparum*, malaria *vivax* dan infeksi campuran .

Spesies parasit	n	Harga TNF rata-rata, pg/ml	Perbedaan Mean p
<i>M. falciparum</i>	58	309,77	Mann-Whitney U P.f-P.v. : $p = 0,017$
<i>M. vivax</i> .	17	119,02	
Infeksi. campuran	3	11,48	Kruskal-Wallis antara ketiga jenis malaria : $p = 0,022$

5.3.2 Perbandingan kadar TNF pada penderita malaria berat dan malaria ringan.

Ternyata kadar TNF rata-rata pada malaria berat, lebih tinggi dari pada penderita malaria ringan, meskipun perbedaan tersebut secara statistik tidak bermakna ($p = 0,226$ pada uji t untuk 2 sampel independen). Lihat tabel 5.9.

Tabel 5.9 Kadar TNF rata-rata pada sampel-sampel serum penderita malaria berat dan malaria ringan.

Beratnya malaria	n	TNF rata-rata pg/ml	Simpang baku	Uji statistik <i>t-independent</i>	
Malaria berat	18	407,80	943,25	p = 0,226	<i>Conf. int.</i> -124,05- 516,85
Malaria ringan	60	211,40	453,16		

5.3.3 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik.

Analisis korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada seluruh penderita (*malaria falciparum* dan *malaria vivax*):

Tabel 5.10 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada seluruh penderita malaria RSUD Mataram (*malaria falciparum* dan *malaria vivax*).

Gejala Klinik	Korelasi dengan derajat parasitemia pada seluruh penderita (<i>m. falciparum</i> & <i>m. vivax</i>)		
	r	p	n
Suhu	0,346	0,001	96
Hb	-0,061	0,551	97
SGOT	0,088	0,393	97
SGPT	0,173	0,090	97
Bilirubin	0,223	0,028	97
Ureum	0,042	0,680	97
Kreatinin	0,061	0,554	97

Dari tabel 5.10 ini dapat dilihat bahwa bila ditinjau dari seluruh penderita, korelasi antara derajat parasitemia dan gejala klinik, hanya ditemukan pada dua komponen gejala klinik, yaitu peningkatan suhu dan peningkatan kadar bilirubin, yang merupakan komponen-komponen gejala yang tidak mencerminkan gangguan fungsi organ yang bersangkutan.

Oleh karena itu, dicoba melakukan analisis secara terpisah antara malaria *falciparum* dan malaria *vivax*. Dari analisis terpisah itu, dapat dilihat adanya perbedaan antara *P. falciparum* dan *P. vivax*.

Tabel 5.11 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada penderita malaria *falciparum*.

	Korelasi dengan derajat parasitemia pada malaria <i>falciparum</i>		
	r	p	n
Suhu	0,328	0,005	73
Hb	-0,039	0,743	73
SGOT	0,069	0,565	73
SGPT	0,120	0,311	73
Bilirubin	0,189	0,110	73
Ureum	0,036	0,760	73
Kreatinin	0,048	0,686	73

Pada penderita malaria *falciparum* (tabel 5.11) terlihat bahwa :

1. Korelasi yang bermakna hanya ditemui antara derajat parasitemia dengan gejala demam ($r = 0,328$; $p = 0,005$).
2. Untuk gejala-gejala lain, diperoleh koefisien korelasi kecil dan tidak bermakna.

Tabel 5.12 Korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik pada penderita malaria *vivax*.

	Korelasi dengan derajat parasitemia pada malaria <i>vivax</i>		
	r	p	n
Suhu	0,473	0,035	20
Hb	- 0,170	0,474	20
SGOT	0,242	0,304	20
SGPT	0,432	0,057	20
Bilirubin	0,395	0,085	20
Ureum	0,072	0,764	20
Kreatinin	0,271	0,247	20

Sedang pada penderita malaria *vivax* (tabel 5.12) dapat dilihat bahwa :

1. Korelasi yang bermakna juga ditemukan antara derajat parasitemia dengan demam ($r = 0,473$; $p = 0,035$).
2. Untuk gejala yang lain, meskipun korelasi tidak bermakna, tetapi memperlihatkan koefisien korelasi yang lebih besar dari pada penderita malaria *falciparum*.

5.3.4 Korelasi antara kadar TNF dengan derajat parasitemia.

Tabel 5.13 Korelasi antara kadar TNF dalam serum dan derajat parasitemia penderita malaria *falciparum*, malaria *vivax*, dan infeksi campuran

Derajat parasitemia (1 s/d 4)	Korelasi dengan kadar TNF		
	r	n	p
malaria <i>falciparum</i>	- 0,096	58	0,472
malaria <i>vivax</i>	0,027	17	0,919
infeksi campuran	0,396	3	0,741

Dari tabel 5.13 dapat dilihat bahwa tidak ada hubungan antara kadar TNF dengan derajat parasitemia, pada malaria *falciparum* ($r=0,096$; $p=0,472$), malaria *vivax* ($r= 0,027$; $p= 0,919$), maupun infeksi campuran ($r=0,396$; $p=0,741$).

5.3.5 Korelasi antara kadar TNF dengan beratnya gejala klinik malaria.

Tabel 5.14 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada penderita malaria *falciparum* di RSUD Mataram.

Gejala Klinik	Korelasi dengan kadar TNF pada malaria <i>falciparum</i>		
	r	p	n
Suhu	-0,173	0,197	57
Hb	0,161	0,232	57
SGOT	-0,029	0,832	57
SGPT	-0,001	0,996	57
Bilirubin	-0,099	0,462	57
Ureum	-0,090	0,508	57
Kreatinin	-0,099	0,462	57

Dari analisis atas penderita malaria *falciparum* (tabel 5.14) dapat dilihat bahwa tidak ada korelasi yang bermakna antara kadar TNF dengan gejala klinik.

Tetapi analisis atas penderita malaria *vivax* (tabel 5.15), menunjukkan hasil sedikit berbeda :

1. Terdapat korelasi positif antara kadar TNF dengan indikator - indikator gangguan fungsi hati ($r = 0,631$; $p = 0,007$ untuk SGOT dan $r = 0,437$; $p = 0,079$ untuk SGPT), kecuali kadar bilirubin total.

2. Khusus untuk bilirubin total, memang tidak terdapat korelasi dengan kadar TNF ($r = -0,164$; $p = 0,529$), demikian juga untuk gejala demam dan anemia.
3. Untuk gangguan fungsi ginjal, meskipun tidak bermakna, terlihat koefisien korelasi yang lebih besar dari pada penderita malaria *falciparum*.

Ini dapat diartikan bahwa pada infeksi *P. vivax* peningkatan kadar TNF dapat mempunyai hubungan dengan gangguan fungsi hati, dan dapat berpartisipasi pada gangguan fungsi ginjal.

Tabel 5.15 Korelasi antara kadar TNF dalam serum dengan gejala klinik pada penderita malaria *vivax* di RSUD Mataram

	Korelasi dengan kadar TNF pend. malaria <i>vivax</i>		
	r	p	n
Suhu	- 0,107	0,681	17
Hb	0,144	0,581	17
SGOT	0,631	0,007	17
SGPT	0,437	0,079	17
Bilirubin	- 0,164	0,529	17
Ureum	0,326	0,201	17
Kreatinin	0,265	0,304	17

5.3.6 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada malaria ringan dan malaria berat.

Pada pemilahan kasus malaria ringan dan malaria berat terlihat bahwa pada kasus-kasus malaria berat, korelasi positif yang bermakna dengan kadar TNF hanya ditemukan pada kadar Hb pada malaria *vivax*.

Tabel 5.19 Hasil pengukuran daya hambat serum penderita terhadap produksi TNF secara in vitro disertai hari pengambilan sampel dan parasit yang ditemukan dalam sediaan hapusan

Puskesmas							RSU Mataram						
No.	No. kode pend	No. sampel	Hari sakit	Spesies parasit dan derajat parasiti temia	Daya hambat produksi TNF (%)		No	No kode pend	No sampel	Hari sakit	Spesies parasit dan derajat parasiti temia	Daya hambat produksi TNF (%)	
					Antigen							Antigen	
					L5*	G-5**						L-5	G-5
1	8	1	1	V3	0	0	1	28	1	2	4V	12	25
		3	44	Neg	17	17			2	4	4V		
									3	10	1V	75	0
2	9	1	1	F4	0	6	2	29	1	1	4F	0	0
		2	25	Neg	0	0			2	5	1F+G		
									3	12	1F+G	0	9
3	14	1	-18	Neg	9	12	3	31	1	5	4F	0	0
		2	1	F2	0	20			2	9	0		
		3	25	F1/V1	15	0			3	15	0	26	0
		4	44	V1	15	40							
4	15	1	7	F2	33	32	4	32	1	2	1F+G	0	0
		2	31	Neg	0	2			2	6	1F+G		
		3	50	Neg	14	3			3	11	0	16	0
5	16	1	2	F2	30	15	5	33	1	2	1F	35	68
		2	26	Neg	16	32			2	4	0		
									3	11	0	60	0
6	17	1	7	F1	8	17	6	52	1	3	3F+G	19	0
		2	31	Neg	46	59			2	10	0		
		3	50	Neg	0	0			3	18	0	23	9
7	18	1	1	V3	92	61	7	56	1	2	4V	61	23
		2	25	V3	19	38			2	11	0		
		3	44	V2	29	94			3	18	0	42	34
8	20	1	2	F3	32	7							
		2	26	Neg	16	1							
		3	45	Neg	0	0							
9	23	1	3	F3	30	24							
		2	27	Neg	6	0							
		3	46	Neg	0	0							

L5* = Hasil pengukuran daya hambat serum penderita dalam konsentrasi 5% terhadap stimulasi antigen galur Lo-2 yang berasal dari Lombok

G5** = Hasil pengukuran daya hambat serum penderita dalam konsentrasi 5% terhadap stimulasi antigen G-2300 yang berasal dari (taman Jaya/Papua).

5.5 Analisis Hasil Pengukuran Daya Hambat Produksi TNF dalam Serum Penderita Malaria.

5.5.1. Analisis perbedaan harga rata-rata daya hambat serum penderita dan korelasi hasil pengukuran daya hambat terhadap stimulasi kedua macam antigen yang dipakai.

Uji t pada sampel berpasangan menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara hasil-hasil pengukuran pada L-5 dan G-5 ($p = 0,301$).

Tabel 5.20 Perbandingan harga rata-rata daya hambat produksi TNF dari serum penderita terhadap stimulasi antigen Lo-2 dan G-2300.

	Harga rata-rata (%) daya hambat serum	p <i>paired samples t-test</i>
L-5	21,80	0,301
G-5	17,88	C.I.: Lower -3,64 Upper :11,49

Uji korelasi Pearson juga menunjukkan ada korelasi besarnya daya hambat produksi TNF terhadap stimulasi dengan kedua macam antigen ($r = 0,472$; $p = 0,001$).

Oleh karena itu, analisis selanjutnya hanya akan dikerjakan untuk daya hambat terhadap satu macam antigen, yaitu Lo-2 yang merupakan galur lokal dari Lombok.

5.5.2 Fluktuasi harga rata-rata daya hambat serum penderita pada L-5.

Harga rata-rata yang diperoleh pada sampel-sampel pengambilan pertama dan ketiga dari RSU dapat dibaca pada tabel 5.21. Harga rata-rata yang diperoleh dari

sampel-sampel pertama, kedua (pada *follow up* pertama) dan ketiga (*follow up* kedua) penderita Puskesmas tercantum pada tabel 5.22. Kurva fluktuasi daya hambat produksi TNF rata-rata sepanjang penelitian untuk penderita-penderita RSU dan Puskesmas dapat dilihat pada gambar 5.4

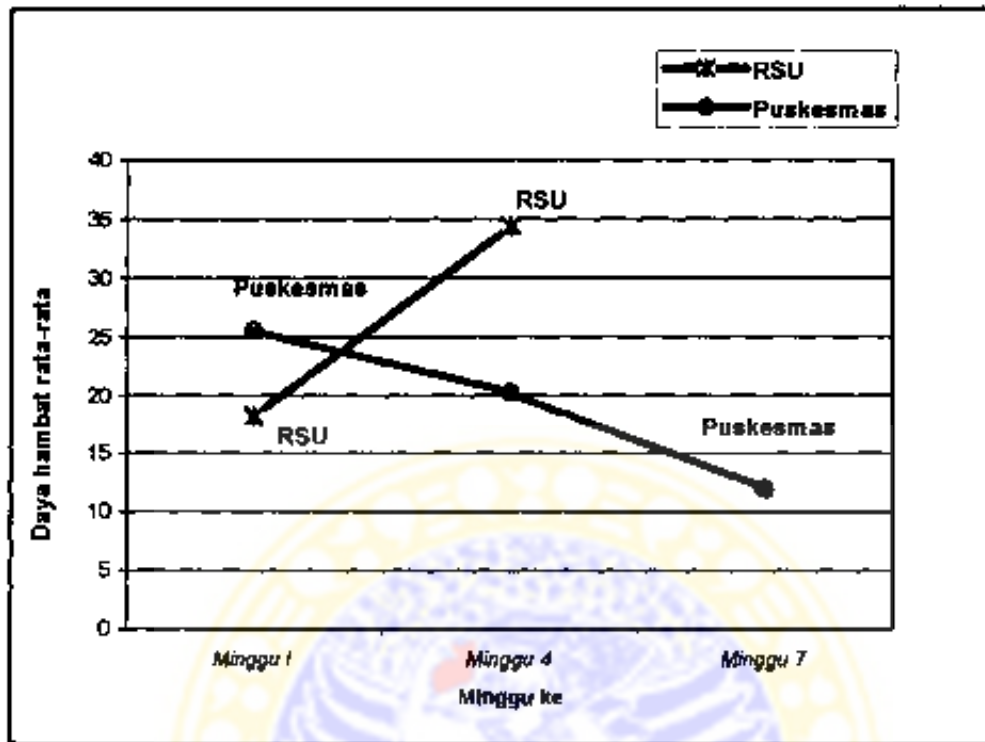
Tabel 5.21 Harga rata-rata daya hambat pada serum penderita RSU Mataram untuk sampel-sampel pada pengambilan pertama dan ketiga.

	Sampel I	Sampel III
Daya hambat	18,22	34,41

Dari tabel 5.22 dan gambar 5.4 dapat dilihat adanya penurunan daya hambat serum pada sampel-sampel yang diambil pada masa konvalesen, yaitu pada minggu ketujuh (untuk penderita Puskesmas). Hal ini juga dapat dilihat pada gambar 5.2 dan 5.3. Berbeda dengan daya hambat yang terukur pada sampel-sampel dari RSU Mataram yang malah meningkat pada pemeriksaan terakhir.

Tabel 5.22 Harga rata-rata daya hambat serum penderita Puskesmas untuk sampel-sampel pada pengambilan pertama, kedua dan ketiga.

	Sampel I	Sampel II (minggu keempat)	Sampel III (minggu ketujuh)
Daya hambat	25,52	20,27	11,95



Gambar 5.4 Kurve harga rata-rata daya hambat serum penderita RSU mataram dan Puskesmas dengan sistim L5.

5.5.3 Perbandingan daya hambat serum penderita *P. falciparum* dan *P. vivax*

Perbandingan harga rata - rata daya hambat pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* dapat dilihat pada tabel 5.23.

Tabel 5.23 Harga rata-rata daya hambat serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di RSU Mataram.

	n	Daya hambat
<i>P. falciparum</i>	27	17,6
<i>P. vivax</i>	9	38,6
p (t - independent samples)		0,007
Confidence Interv.		L: - 39,40 H: - 6,66

5.5.4 Korelasi antara daya hambat produksi TNF dalam serum penderita dengan kadar TNF.

Dari tabel 5.24 di bawah ini terlihat bahwa:

1. Untuk *P. falciparum* : tidak ada korelasi yang bermakna antara kadar TNF dengan daya hambat serum.
2. Untuk *P. vivax* : terdapat korelasi yang tinggi dan sangat bermakna antara kadar TNF dengan daya hambat serum

Tabel 5.24 Korelasi antara daya hambat serum penderita malaria dengan kadar TNF.

Korelasi daya hambat dengan TNF	r	n	p
Malaria <i>falciparum</i>	-0,115	8	0,787
Malaria <i>vivax</i>	-1,000	4	0,01

5.5.5 Analisis korelasi antara daya hambat serum penderita dengan gejala klinik malaria.

5.5.5.1 Perbandingan daya hambat pada penderita malaria berat dan malaria ringan.

Analisis seperti yang ditampilkan pada), tabel 5.25 menunjukkan bahwa harga rata-rata daya hambat pada serum-serum penderita malaria berat lebih tinggi dari pada penderita malaria ringan, tetapi secara statistik perbedaannya tidaklah bermakna ($p=0,126$).

Tabel 5.25 Perbandingan daya hambat rata-rata serum penderita malaria berat dan malaria ringan

	Daya hambat	p (t-independent)
Malaria berat n = 6	38,67	0,126
Malaria ringan. n = 8	17,13	

5.5.5.2 Korelasi daya hambat dengan parameter-parameter gejala klinik pada penderita malaria *falciparum*.

Tabel 5.26 Korelasi antara daya hambat serum dengan gejala klinik pada penderita malaria *falciparum*.

Gejala Klinik	Korelasi dengan daya hambat		
	n	r	p
Suhu	9	- 0,362	0,339
Hb	9	0,524	0,148
SGOT	9	0,736	0,024
SGPT	9	0,260	0,500
Bilirubin	9	- 0,397	0,290
Ureum	9	- 0,510	0,161
Kreatinin	9	0,305	0,425

Analisis pada tabel 5.26 menunjukkan bahwa :

1. Terdapat korelasi positif yang bermakna dengan SGOT ($r = 0,736$; $p = 0,024$).
2. Untuk gejala-gejala lain, koefisien korelasi menunjukkan derajat dan kemaknaan yang tidak konsisten.

5.5.5.3 Korelasi daya hambat dengan parameter-parameter gejala klinik pada penderita malaria *vivax*:

Tabel 5.27 Korelasi antara daya hambat serum dengan gejala klinik pada penderita malaria. *vivax* di RSUD Mataram.

Gejala Klinik	Korelasi dengan daya hambat		
	n	r	p
Suhu	4	- 0,648	0,352
Hb	4	- 0,062	0,938
SGOT	4	- 0,838	0,162
SGPT	4	- 0,377	0,623
Bilirubin	4	- 0,104	0,896
Ureum	4	- 0,582	0,418
Kreatinin	4	- 0,487	0,513

Analisis pada tabel 5.27 menunjukkan bahwa :

1. Semua korelasi bersifat negatif, berarti adanya daya hambat dapat menurunkan gejala klinik, kecuali untuk kadar Hb.
2. Korelasi antara daya hambat serum dengan gejala klinik tersebut tidak cukup bermakna, tetapi menunjukkan koefisien korelasi yang lebih tinggi dari pada koefisien korelasi yang ditunjukkan oleh penderita malaria *falciparum*.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pelaksanaan Penelitian dan Permasalahannya.

Penelitian langsung pada penderita seperti pada penelitian ini, meskipun dalam pelaksanaannya banyak kendala yang dihadapi, mempunyai kelebihan dari pada penelitian eksperimen pada hewan percobaan, oleh karena :

1. Penelitian semacam ini pada hewan percobaan telah banyak dilakukan di sentra-sentra penelitian besar di negara maju, di mana dapat diperoleh fasilitas penelitian yang lebih baik tetapi tidak ditemukan cukup penderita malaria.
2. Gejala-gejala dan proses patologi yang ditemukan pada hewan percobaan tidak sama dengan yang ditemukan pada manusia. Adanya kesukaan dan kekhususan hospes ini telah menjadi kendala utama dalam penelitian-penelitian patogenesis malaria (Gysin, 1998). Oleh karena itu, masih selalu diperlukan penelitian langsung pada penderita.
3. Penelitian langsung pada penderita dapat mengamati keadaan yang sebenarnya, di mana banyak faktor yang berpengaruh saling berinteraksi.
4. Situasi dan kondisi di daerah dengan tingkat endemisitas yang berbeda dapat mempengaruhi manifestasi malaria (Druilhe, 1987; Riley 1999). Hal ini tidak akan dapat ditiru secara lengkap dengan penelitian pada binatang percobaan.

Adapun kendala-kendala yang dialami antara lain seperti duraikan berikut ini. Pada pengumpulan sampel gelombang pertama di RSUD Mataram selama 17 bulan di

tahun 1993-1994, telah berhasil dikumpulkan sampel dari 52 penderita malaria. Tetapi pada uji awal untuk mengukur daya hambat serum terhadap produksi TNF, yang dilakukan selama tujuh-setengah bulan di Leiden, ternyata tidak diperoleh hasil daya hambat yang diharapkan. Beberapa sampel ternyata justru menunjukkan stimulasi/potensiasi produksi TNF. Dari kepustakaan terbaru pada saat itu diperoleh rujukan bahwa daya hambat serum tersebut kadarnya baru mencapai puncak pada minggu ketiga sesudah penderita masuk rumah sakit. Oleh karena itu, diduga bahwa daya hambat belum terbentuk pada sampel-sampel yang sudah dikumpulkan, sebab sampel dengan rentang waktu terpanjang yang terkumpul pada waktu itu adalah 19 hari. Karena itu akan dilakukan pengumpulan sampel kembali dengan rentang waktu yang lebih panjang agar dapat mengikuti fluktuasi naik turunnya daya hambat tersebut.

Percobaan pengumpulan sampel ulang di RSUD Mataram selama 7 bulan di tahun 1995 tidak memberikan hasil, karena adanya perubahan musim dan terjadinya angin kencang yang merubah populasi vektor sehingga kasus malaria sangat menurun. Demikian juga percobaan pengumpulan sampel di beberapa Puskesmas di sekitar Mataram serta pulau Sumbawa dalam tahun 1996, tidak memberikan hasil terutama karena parasitemia yang sangat rendah. Sampel tambahan baru berhasil diperoleh di dua Puskesmas di Kabupaten Lombok Barat, yaitu di Puskesmas Gangga dan Tanjung serta daerah sekitarnya di akhir tahun 1997 sampai awal 1998. Awalnya penderita diperoleh dari Puskesmas, kemudian dilakukan kunjungan rumah untuk melakukan pengambilan longitudinal dengan jarak waktu 3-4 minggu. Tetapi pada saat itu, tidak

dapat diperoleh tabung *venoject* yang tepat karena kesukaran impor, sehingga TNF tidak dapat dideteksi dan diukur kadarnya dengan tepat.

Jadi akhirnya ada dua kelompok sampel yang dapat dimanfaatkan untuk analisis yang berbeda. Kelompok sampel dari RSUD Mataram, dimana dapat dilakukan pemeriksaan fisik dan laboratorium cukup lengkap, dimanfaatkan untuk Tujuan Penelitian Bagian Pertama, yaitu analisis gejala klinik dan hubungannya dengan kadar TNF dan daya hambat serum terhadap produksi TNF secara *in vitro* pada sebagian penderita. Sedang kelompok sampel dari Puskesmas Gangga dan Tanjung, dimana tidak dapat dilakukan pemeriksaan laboratorium dan pengukuran kadar TNF, lebih ditekankan kepada evaluasi fluktuasi daya hambat serum terhadap produksi TNF.

Sebenarnya direncanakan untuk menganalisis perubahan kapasitas stimulasi produksi TNF pada antigen malaria yang mungkin terjadi pada pengambilan sampel longitudinal seperti yang ditemukan oleh Brown dan Hills (1974), serta adanya perbedaan antigen antar penderita. Sehubungan dengan tujuan ini, maka dipilih penderita dengan parasitemia tinggi agar dapat dibiakkan, dan diusahakan agar lama kunjungan untuk setiap tahap tidak lebih dari tiga hari agar sampel darah bisa segera dibiakkan di Surabaya. Tetapi ternyata isolat-isolat dengan parasitemia tinggi yang sudah berhasil ditumbuhkan dalam biakan selama beberapa minggu, tidak dapat mencapai derajat parasitemia 10% (syarat untuk pembuatan antigen untuk keperluan ini), karena kemudian parasit berubah menjadi gametosit bila tingkat parasitemia sudah agak tinggi. Ini berkali-kali terjadi dalam beberapa tahap pengumpulan sampel. Oleh karena itu, hanya digunakan dua isolat yang berhasil memenuhi syarat, yaitu galur Lo-2 yang diperoleh dari seorang penderita di Puskesmas Tanjung dalam salah

kondisi yang sama untuk seluruh sampel tersebut . Hal ini membawa kendala keterbatasan tenaga dan sarana karena harus menggelar volume kerja yang besar sekaligus. Dan oleh karena untuk setiap sampel dibutuhkan enam sumur uji dan enam sumur kontrol, maka sampel yang dapat dikerjakan sekaligus hanya sedikit jumlahnya. Oleh karena itu, hanya sebagian saja dari sampel yang dikumpulkan, dapat diukur daya hambatnya.

6.2 Pembahasan Hasil Penelitian Bagian Pertama.

6.2.1 Distribusi malaria berdasarkan spesies parasit penyebabnya dan kemungkinan terjadinya perubahan distribusi tersebut.

Prevalensi spesies Plasmodium di suatu daerah biasanya dapat dihubungkan dengan kecenderungan mayoritas bentuk klinis malaria di daerah tersebut. oleh karena bentuk malaria berat dengan komplikasi-komplikasi hanya ditemukan pada penderita malaria falciparum (Bradley, 1995; Warrell, *et al.*, 1990).

Distribusi spesies pada bab 5.2 menunjukkan angka proporsi yang hampir sama di RSUD dan Puskesmas, yaitu 73,1% *P. falciparum*, 21,1% *P. vivax* dan 5,7% infeksi campuran diantara penderita RSUD, dan 78,9% *P. falciparum* dan 21,1% *P. vivax* di Puskesmas. Hasil ini agak berbeda dengan distribusi yang diperoleh pada tahun 1991-1992 yaitu dari 210 kasus di RSUD, 48,1% adalah *P. vivax*, 43,33% *P. falciparum* dan 8,50% merupakan infeksi campuran (Soewignjo, *et al.*, 1992).

Adanya kemungkinan pergeseran distribusi spesies dikalangan terbatas, memang sangat dimungkinkan. Dari 19 penderita Puskesmas, 6 penderita mengalami infeksi

baru atau superinfeksi dengan *P. vivax* pada survei kedua, dan pada survei ketiga 7 minggu kemudian, distribusi ini sudah sangat berbeda, yaitu tinggal 6 orang yang positif malaria dengan perbandingan 1 kasus murni *P. falciparum*, 2 kasus murni *P. vivax* dan 3 infeksi campuran. Sebagaimana yang terjadi pada contoh sampel kecil ini, perubahan proporsi mungkin saja terjadi pada populasi yang lebih besar. Hal ini juga dialami pada survey yang dilakukan oleh Dachlan dan kawan-kawan pada tahun 1992-1993 di 3 dusun di Kabupaten Lombok Barat. Dalam survey longitudinal selama hampir satu tahun tersebut, pada umumnya prevalensi *P. falciparum* lebih besar dari pada *P. vivax*, namun ada kalanya terjadi lonjakan kasus *P. vivax* di suatu daerah (Dachlan, *et al.*, 1993).

Bertambahnya kasus *P. vivax* pada sampel-sampel *follow up* di Puskesmas, dapat disebabkan oleh

1. Adanya sumber infeksi lama *P. vivax* yang baru ditularkan, atau sumber infeksi baru dari daerah lain.
2. Masa inkubasi atau prepaten yang lebih panjang pada *P. vivax*, sehingga bila terjadi penyebaran yang bersamaan antara *P. vivax* dan *P. falciparum* pada saat awal musim hujan, tetapi *P. vivax* baru terdeteksi dalam sediaan darah beberapa hari setelah *P. falciparum* (Cheesbrough, 1987). Juga telah dilaporkan adanya populasi *P. vivax* dengan masa inkubasi yang panjang, terutama malaria *vivax* yang dijumpai di negara empat musim misalnya di Rusia (Gilles and Warrell, 1993) dan strain dari Korea Utara (WHO, 1987).
3. Adanya *relapse* yang berasal dari bentuk hipnozoit yang tidak diobati (Druilhe, Renia and Fidock, 1998; WHO, 1987).

6.2.2 Gejala klinik malaria dan korelasinya dengan parasit penyebab.

Dari tabel 5.4 dan 5.5. diketahui bahwa tidak seluruh gejala klinik yang biasa ditemukan pada kasus-kasus malaria berat ditemukan pada subyek penelitian ini, oleh karena penderita malaria berat dengan keadaan umum jelek tidak dilibatkan, sesuai dengan etika dan kemanusiaan. Selain itu penderita malaria berat dengan keadaan umum jelek tidak dapat memberikan persetujuan untuk disertakan dalam penelitian, juga tidak dapat dipastikan dapat diambil sampelnya berturut-turut secara longitudinal.

Oleh karena itu, dapat dimengerti bahwa penderita malaria berat hanya merupakan 27% dari seluruh subyek penelitian. Hasil ini sangat berbeda dengan laporan Soewignjo, *et al.* (1992) pada tahun sebelumnya, di tempat yang sama dari 210 penderita malaria, 101 diantaranya dapat digolongkan ke dalam malaria berat, dengan 21 orang dengan malaria serebral, 8 orang dengan gangguan fungsi hati, 21 orang dengan gangguan fungsi ginjal dan 52 orang dengan anemia ringan sampai dengan berat.

Di dalam penelitian ini, penggolongan malaria berat bukanlah dilakukan untuk menentukan prognosis penyakit, melainkan untuk mengetahui hubungannya dengan kadar TNF. Oleh karena itu derajat parasitemia tidak dimasukkan ke dalam penggolongan malaria berat melainkan digunakan untuk mengevaluasi hubungan derajat parasitemia dengan beratnya penyakit dan peningkatan kadar TNF.

6.2.2.1 Hubungan malaria berat dengan spesies parasit.

Dari tabel 5.4 diketahui bahwa pada umumnya gejala/gangguan fungsi organ tampak lebih nyata pada penderita malaria *falciparum* dari pada penderita malaria

vivax dan infeksi campuran. Tetapi tabel 5.2 menunjukkan bahwa persentasi penderita malaria berat tidaklah berbeda secara bermakna antara *P. falciparum* dan *P. vivax*, yaitu 26,3% dan 36,7%. Meskipun hal ini dapat menunjukkan bahwa malaria berat juga dapat ditemukan pada *P. vivax*, justru dengan proporsi lebih tinggi, tetapi hendaknya tidak dilupakan bahwa adanya kriteria eksklusi mengakibatkan banyaknya kasus yang lebih berat pada malaria *falciparum* tidak dilibatkan dalam penelitian ini.

Pada umumnya, para ahli beranggapan bahwa malaria berat hanya ditemukan pada infeksi *P. falciparum* (Pasvol, et al., 1995, Molyneux, 1995a, 1995b; Clark and Cowden, 1999). Ditemukannya banyak penderita *P. vivax* yang mengalami malaria berat pada penelitian ini, mengundang pertanyaan mengenai mekanisme terjadinya malaria berat pada *P. vivax*.

6.2.2.2 Beberapa macam gejala/gangguan fungsi organ dapat ditemukan pada satu penderita.

Adanya afinitas strain *P. falciparum* tertentu terhadap organ tertentu dalam proses sekuestrasi, telah dinyatakan oleh Berendt, Ferguson and Newbold (1990), Grau, et al. (1990) dan Ockenhouse (1994). Dalam penelitian ini terbukti bahwa penderita yang mengalami malaria berat pada umumnya melibatkan lebih banyak organ dari pada penderita malaria ringan. Juga pada kasus-kasus *P. vivax*, ternyata 2 dari 4 penderita malaria berat melibatkan 4 sistem. Di sini terlihat bahwa untuk kasus berat, tidak terlihat adanya predileksi organ.

Pada *P. falciparum*, telah ditemukan adanya kecenderungan individu varian genetik TNF-2 untuk memproduksi TNF secara berlebihan (McGuire, et al., 1994; Roy, et al., 1997; Wilson, et al., 1997), dan varian TNFR2 yang mempunyai kecenderungan

peningkatan ekspresi receptor pada permukaan endotel, sehingga memudahkan proses sekuestrasi *P. falciparum* di dalam organ-organ (Lucas, *et al.*, 1997a). Produksi yang berlebihan dari TNF dan peningkatan ekspresi receptor TNF mungkin sekali tidak menunjukkan predileksi terhadap organ tertentu pada penderita malaria berat, sehingga gangguan fungsi dapat ditemukan pada berbagai organ sekaligus.

6.2.2.3 Korelasi gejala klinik dengan derajat parasitemia.

Menurut Greenwood, *et al.* (1991), tingginya tingkat infeksi atau dosis inokulum sangat menentukan berat/ringannya penyakit pada malaria. Dibutuhkan *cut off value* dari jumlah parasit guna menimbulkan gejala klinik pada malaria.

Dari tabel 5.2 dapat disimpulkan, bahwa terutama pada *P. falciparum*, tidak terlihat kecenderungan kejadian malaria berat kearah derajat parasitemia tertentu. Dan analisis korelasi antara derajat parasitemia dengan masing-masing komponen gejala klinik pada seluruh penderita malaria (*falciparum* dan *vivax*) pada tabel 5.10 dapat diketahui bahwa derajat parasitemia hanya berkorelasi dengan komponen gejala yang tidak mencerminkan gangguan fungsi organ, yaitu demam dan peningkatan kadar bilirubin. Dengan pemilahan jenis malaria berdasarkan spesies penyebab pada tabel 5.11 dan 5.12, dapat ditunjukkan bahwa pada malaria *falciparum*, derajat parasitemia hanya berkorelasi dengan gejala demam, sedang pada penderita malaria *vivax*, selain adanya korelasi antara derajat parasitemia dengan demam, juga terlihat bahwa masing-masing komponen gejala klinik menunjukkan derajat korelasi yang lebih besar dengan derajat parasitemia dari pada pada penderita malaria *falciparum*.

Korelasi yang rendah antara derajat parasitemia dan beratnya gejala klinik pada *P. falciparum* juga telah dilaporkan oleh Emiliana Tjitra (1989b) dalam penelitian di

Thailand. Kremsner, *et al.* (1989) juga menemukan ketiadaan korelasi antara gejala klinik dan derajat parasitemia. Aikawa (1988) juga menyatakan bahwa derajat parasitemia tidak berkorelasi dengan gangguan otak pada otopsi kasus-kasus malaria serebral.

Derajat korelasi yang rendah antara gejala klinik (yang bersangkutan dengan gangguan fungsi organ) dengan derajat parasitemia pada malaria *falciparum*, mengundang dugaan bahwa kemungkinan ada faktor lain yang ikut berperan dalam timbulnya gejala malaria. Faktor tersebut dapat saja berupa TNF. Hal ini akan dianalisis lebih lanjut pada bab 6.3 dan seterusnya.

6.2.3 Analisis Kadar TNF.

6.2.3.1 Hasil pengukuran kadar TNF dalam serum penderita dan kurva waktunya.

Pada penderita malaria dari RSUD Mataram, didapatkan kadar TNF antara 0 s/d 3057 pg/ml dengan rata-rata seluruhnya 256,72 pg/ml. Dari tabel 5.7 diketahui bahwa kadar rata-rata TNF pada sampel-sampel pertama 223,23 pg/ml meningkat pada sampel-sampel kedua (353,44 pg/ml) dan kemudian menurun kembali pada pengambilan ketiga (7,53 pg/ml), dimana pada umumnya penderita sembuh. Kadar TNF pada sampel ketiga ini berada dibawah nilai ambang untuk orang sehat, yaitu 10 pg/ml sesuai dengan laporan Beutler and Cerami (1988) dan Butcher, *et al.* (1990), juga sesuai dengan uji-coba yang telah dilakukan produsen reagen yang digunakan pada penelitian ini. Hal ini sejalan dengan teori mengenai umur paruh (*half life*) TNF yang pendek (Beutler and Cerami, 1990; Harpaz, *et al.*, 1992), dengan

menghilangnya stimulasi antigen setelah pengobatan tentunya kadar TNF cepat menurun.

Pada tabel 6.1 dikumpulkan hasil-hasil pengukuran TNF ditempat-tempat lain. Dari tabel ini diketahui, bahwa hasil pengukuran kadar TNF di RSUD Mataram cukup tinggi bila dibandingkan dengan hasil di tempat lain.

Apakah kadar yang tinggi dari TNF ini merupakan cerminan dari status kekebalan yang rendah dari para penderita malaria di Lombok?

Sebagaimana dinyatakan oleh Harpaz pada infeksi eksperimental pada beberapa sukarelawan, individu yang tidak diimunisasi kadar TNF-nya dapat meningkat pada waktu diberi infeksi tantangan (*challenge infection*), sedang pada individu yang diimunisasi sebelumnya, kadar TNF menunjukkan kecenderungan stabil dalam derajat rendah (Harpaz, *et al.*, 1992). Menurut Grau, *et al.* (1988; 1989 b), Taylor-Robinson (1995) dan Riley (1999), sel T yang telah terpapar (*primed*) terhadap antigen malaria mempunyai efek potensiasi terhadap produksi TNF oleh makrofag pada penderita malaria dengan perantaraan IFN- γ yang diproduksi sel T tersebut. Dan Chizzolini, *et al.* (1990) menyatakan bahwa sel T-CD4⁺ dari penderita malaria akut yang masih rentan (baru mengalami 1-2 kali infeksi malaria dalam beberapa bulan terakhir), bila distimulir dengan antigen malaria secara *in vitro*, akan menghasilkan kadar IFN- γ yang lebih tinggi dari pada sel T dari

individu yang telah kebal terhadap malaria (misalnya penduduk Afrika yang tinggal di daerah endemik dengan transmisi yang stabil sejak kecil).

Jadi bisa disimpulkan bahwa produksi TNF pada individu-individu yang non-imun dan semi-imun, akan lebih tinggi dari pada individu yang sudah imun.

Tabel 6.1 Perbandingan kadar TNF dengan hasil peneliti lain.

Peneliti	Lokasi penelitian	Tingkat endemisitas	Kondisi penderita dan lainnya	Kadar TNF pg/ml
Kwiatkowski <i>et al.</i> , 1989.	Fajara, Gambia	?	34 dari 56 anak malaria ringan	<i>detectable</i> (>39)
			10 dari 19 anak dengan mal. berat	<i>detectable</i>
			1 dari 3 anak dengan mal. fatal	156
Grau, <i>et al.</i> , 1989b	Malawi	tinggi	malaria berat fatal	709 +/- 312
			malaria berat, hidup	184 +/- 31,5
Butcher, <i>et al.</i> , 1990	Kepulauan Solomon	?	panas, parasit +	0-728
			panas, parasit -	0-39
Shaffer, <i>et al.</i> , 1991	Zaire	?	Anak <i>Pfalciparum</i> + semua/rata-rata	0-9400/41
			Malaria berat	110
Karunawecra, <i>et al.</i> , 1992	Colombo, Sri Lanka	non-endemik	malaria vivax	puncak:264,6-2104,1 random :17,38-173,8
			malaria <i>falciparum</i> ringan	random: 20-29
			malaria <i>falciparum</i> berat	36-72
			malaria <i>falciparum</i> fatal	170-431
Boudin, <i>et al.</i> , 1994	Burkina Fasso, Afrika	65 infectious bite/yr	Anak dengan recent malaria attacks	30,2
			Anak tanpa riwayat mal. attack sebelumnya	84,7
Chuncharunec, <i>et al.</i> , 1997	Thailand	?	Normal/sehat	15 +/- 5
			Malaria ringan.	339 +/- 12
			Malaria berat	496 +/- 64
Sri-Hidajati, 2000	Lombok, Indonesia	hipo-meso endemik	Orang dewasa	
			Seluruh penderita	0 -3057 (rata-rata 256,72)
			Malaria berat	407,8

Kadar TNF yang tinggi pada penderita malaria di Mataram tersebut mungkin saja merupakan cerminan status non-imun atau semi-imun dari penderita malaria di Mataram/Lombok, sejalan dengan tingkat transmisi malaria yang rendah di daerah hipo-mesoendemik ini. *Inoculation rate* yang rendah di sana, tidak cukup untuk merangsang kekebalan. Hal ini juga terbukti pada penelitian-penelitian sebelumnya, yang menunjukkan adanya peningkatan sesuai dengan umur (*age-dependency*) dari prevalensi parasit maupun serologi dengan kurva yang landai yang khas bagi daerah dengan endemisitas rendah (Dachlan, *et al.*, 1994; Sri-Hidayati, *et al.*, 1997). Kurve ini akan sangat berbeda dengan daerah dengan endemisitas tinggi, adanya pemaparan parasit sejak muda menyebabkan kurva melengkung langsung keatas (Deloron, *et al.*, 1989; Hogh, *et al.*, 1991).

Keadaan semi-imun pada malaria mempunyai arti khusus. Pada penderita ini, infeksi malaria justru dapat berlangsung lebih serius karena adanya amplifikasi produksi TNF oleh sel-sel T yang sudah pernah terpapar seperti dinyatakan di atas (Taylor-Robinson, 1995; Riley, 1999). Bila diperhatikan bahwa kasus penderita malaria dewasa di RSUD lebih tinggi dari pada kasus malaria pada anak-anak, maka kejadiannya mungkin dapat disetarakan dengan para imigran Jawa yang tinggal di Irian Jaya seperti yang dilaporkan oleh Baird, *et al.*(1993, 1998). Pada individu-individu ini, telah tersedia sel Th1 CD4+ yang matang (Grau 1988; Grau *et al.*; 1989b; Riley 1999), yang dapat mengamplifikasi produksi TNF pada makrofag. Sebagaimana diuraikan pada bab 2.4.4 (Malaria serebral), amplifikasi produksi TNF oleh sel T mungkin diperantarai oleh sitokin-sitokin IFN-gamma, IL-3 dan GM-CSF (Grau, *et al.*, 1990). "*Priming*" atau pemaparan pertama tidak harus berupa antigen malaria, te-

tapi dapat berupa "*cross-reacting antigens*" (Taylor-Robinson, 1995; Riley 1999).

Diantara penderita-penderita malaria di RSUD Mataram ini juga ada yang masih mengandung parasit sampai pengambilan sampel ketiga lebih kurang 19 hari sesudah penderita MRS. Apakah penderita ini dapat digolongkan semi-imun atau imun? Demikian juga pada kasus dari Puskesmas, didapati dua orang penderita *P. vivax* yang masih positif pada pemeriksaan ketiga (7 minggu sesudah pengambilan pertama) namun penderita bisa melakukan aktivitas sehari-hari tanpa keluhan (tabel 5.19 : penderita nomor 14 dan 18). Sayang bahwa pada kedua penderita ini pengukuran kadar TNF mengalami kegagalan. Persentasi daya hambat pada penderita – penderita ini menunjukkan angka yang tetap tinggi pada pengambilan sampel terakhir.

6.2.3.3 Korelasi antara kadar TNF dengan spesies parasit penyebab.

Kadar rata-rata TNF pada *P. falciparum* lebih tinggi secara bermakna dari pada *P. vivax* (309,77 pg/ml dibandingkan 119,02 pg/ml, $p = 0,0017$) dan infeksi campuran (11,48 pg/ml, $p = 0,022$). Hal ini dapat disebabkan adanya perbedaan kemampuan stimulasi produksi TNF dari antigen kedua spesies *Plasmodium* ini, sebagaimana juga ditemukan perbedaan di antara galur-galur *P. falciparum* sendiri (Allan, *et al.*, 1993, 1995; Picot, *et al.*, 1990, 1993). Bila TNF memang berperan dalam timbulnya gejala klinik malaria, maka kadar TNF yang lebih tinggi ini dapat berpartisipasi pada beratnya gejala pada malaria *falciparum*.

Karunaweera, *et al.* (1992b) memperoleh hasil pengukuran kadar TNF puncak pada penderita malaria *vivax*, lebih tinggi bila dibandingkan pengukuran pada penderita malaria *falciparum* secara *random* maupun penderita malaria *falciparum*

berat serta kasus-kasus fatal. Pada kasus-kasus Karunaweera tersebut, kecuali pada malaria *vivax*, pengukuran tidak dilakukan khusus pada saat kadar TNF memuncak. Sedangkan pada penelitian di RSUD Mataram ini, pengukuran kadar TNF dilakukan pada saat penderita kumat panasnya, dan ini berlaku untuk penderita malaria *vivax* maupun *falciparum*, sehingga diharapkan komparasi kadar TNF pada kedua spesies lebih dapat dipercaya, dan dapat dilakukan perbandingan dengan responden penelitian Karunaweera pada kadar puncak pada malaria *vivax*.

Saat atau "timing" pengambilan sampel atau pengukuran kadar TNF ini, juga dapat menerangkan mengapa pada subjek penelitian ini kadar TNF-nya tinggi meskipun penderita tidak menunjukkan gejala klinik yang berat. Mungkin sekali bahwa pada penelitian-penelitian yang di-sitir di atas, pengukuran tidak dilakukan pada saat kadar TNF berada pada puncak. Atau TNF mengalami konsentrasi atau akumulasi di dalam organ sebagaimana akan dikupas pada bab selanjutnya. Di samping itu ada kemungkinan TNF yang terukur tersebut merupakan TNF yang telah terikat oleh *soluble TNF-receptor*.

6.2.3.4 Korelasi antara kadar TNF dengan tingginya parasitemia.

Analisis menunjukkan tidak ada korelasi antara kadar TNF dengan derajat parasitemia, baik pada *P. falciparum*, *P. vivax* maupun infeksi campuran (tabel 5.13). Hal ini tidak menyokong pendapat Greenwood, *et al.* (1991) bahwa ada "cut off value" dari jumlah parasit dalam darah untuk timbulnya gejala klinik malaria. Namun Warrell, *et al.* (1990) juga menyatakan bahwa penderita malaria berbeda-beda dalam "ketahanannya" mengandung parasit malaria. Memang pada umumnya 5% telah

dianggap merupakan kasus yang serius, namun banyak penderita yang mengalami parasitemia lebih dari 30% dapat sembuh dengan terapi memadai.

Tidak adanya hubungan antara kadar TNF dengan tingginya parasitemia ini berbeda dengan hasil percobaan *in vitro*, misalnya oleh Bate (1988) dan Picot, *et al.* (1990) dan hasil-hasil uji awal dalam penelitian ini sendiri, yang menggambarkan adanya "dose-dependent" dalam tingginya produksi TNF oleh sel-sel monosit sebagai respon atas stimulasi antigen yang berbeda-beda konsentrasinya. Demikian juga pada kasus-kasus klinik dalam penelitian Butcher, *et al.* (1990), Molineux, *et al.* (1989), Grau, *et al.* (1990) dan Shaffer, *et al.* (1991), ditemukan korelasi positif antara konsentrasi TNF dalam serum dengan kepadatan parasit.

Tidak adanya hubungan antara kadar TNF dengan derajat parasitemia ini mungkin disebabkan antara lain oleh:

1. Perbedaan daya stimulasi produksi TNF dari galur-galur parasit penyebab, sebagaimana dinyatakan oleh Allan, *et al.* (1993, 1995) dan Picot, *et al.* (1993), yang menyebabkan perbedaan hasil perhitungan secara kolektif.
2. Adanya produksi lokal dan akumulasi TNF di dalam organ tempat sekuestrasi, serta adanya reseptor pada permukaan endotel dan sel lain yang dapat menangkap TNF di tempat tersebut sehingga TNF tidak mencapai sirkulasi umum seluruhnya (Lucas, *et al.*, 1997a; 1997b; Janeway, *et al.*, 1999).
3. Adanya fluktuasi kadar TNF seperti yang telah dinyatakan oleh Kwiatkowski, *et al.* (1989b) dan Karunaweera, *et al.* (1992b). Sedangkan derajat parasitemia pada *P. vivax* tidak mengalami fluktuasi sebagaimana *P. falciparum* di mana stadium-stadium yang lebih tua mengalami sekuestrasi di dalam pembuluh darah di organ-

organ. Jadi ada perbedaan efek waktu terhadap derajat parasitemia dan kadar TNF pada malaria *vivax*, yang menyebabkan tidak adanya korelasi.

6.2.3.5 Korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik malaria.

6.2.3.5.1 Perbandingan kadar TNF pada penderita malaria berat dan malaria ringan.

Kadar TNF rata-rata pada penderita malaria berat lebih tinggi dari pada penderita malaria ringan, meskipun tidak bermakna (407,80 pg/ml dibandingkan dengan 211,40 pg/ml dengan $p = 0,226$). Hal ini serupa dengan temuan sebelumnya oleh Clark (1987a, 1987b; 1992), Grau, *et al.* (1989), Kern, *et al.* (1989), Grau (1990) dan Kwiatkowski, *et al.* (1990), yang membawa para peneliti tersebut menyimpulkan bahwa TNF dapat berperan dalam timbulnya gejala malaria berat.

6.2.3.5.2 Korelasi antara kadar TNF dengan komponen-komponen gejala klinik.

Hasil analisis yang ditunjukkan pada tabel-tabel 5.14 dan 5.15, dapat diterangkan sebagai berikut:

1. Pada infeksi *P. falciparum* : tidak adanya korelasi (semua menunjukkan koefisien korelasi $<0,200$ dan tidak bermakna) antara kadar TNF dalam serum penderita dengan masing-masing komponen gejala klinik. Lihat bab 6.3.5.3.
2. Pada infeksi *P. vivax* : hasil analisis korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik agak berbeda. Adanya koefisien korelasi yang lebih besar dengan gangguan

fungsi hati, dapat diartikan bahwa peningkatan kadar TNF di dalam sirkulasi dapat mempunyai hubungan erat dengan gangguan fungsi hati. Sebagaimana dilaporkan oleh Karunawacera, *et al.* (1992a, 1992b), puncak kadar TNF dalam sirkulasi pada malaria *vivax* dapat tinggi sekali, dan ini dapat berakibat gangguan fungsi organ termasuk hati. Dan Turner, *et al.* (1998) juga menandai bahwa pada malaria, baik yang berat maupun yang ringan, terjadi aktivasi endotel secara sistemik. Adanya sinusoid-sinusoid di dalam hepar dapat menyebabkan TNF yang diproduksi di dalam sirkulasi pada malaria *vivax* berpengaruh kepada sel parenkim hati dan menginduksi aktivitas iNOS serta menimbulkan gangguan fungsi meskipun tidak terjadi sekuestrasi. Tidak adanya korelasi dengan gejala demam dan anemia, mungkin disebabkan adanya faktor lain yang lebih berpengaruh, misalnya derajat parasitemia untuk demam, seperti hasil analisis pada bab 5.3.3., dan faktor lain yang dikupas pada bab 6.3.6.3. Demikian juga untuk anemia (lihat bab 2).

6.2.3.5.3 Mengapa tidak ditemukan korelasi antara kadar TNF dan gejala klinik pada *P. falciparum* ?

Fakta tentang tidak adanya korelasi antara TNF dengan beratnya gejala klinik pada *P. falciparum*, juga ditemui pada penelitian dengan 75 penderita anak-anak di Gambia. Di sana Kwiatkowski, *et al.* (1989b) tidak menemukan korelasi antara kadar TNF dengan tingginya temperatur tubuh, dengan derajat parasitemia, kadar Hb, jumlah neutrofil dan hipoglikemia. Persentasi TNF positif malah lebih rendah pada anak dengan malaria berat dan anak yang meninggal karena malaria serebral dari pada anak dengan malaria akut (malaria ringan). Hermsen, *et al.* (1997a) juga telah

membuktikan hal ini pada tikus-tikus yang diinfeksi dengan *P. berghei* dan ternyata timbulnya gejala malaria serebral tidak tergantung dari kadar TNF dalam sirkulasi.

Kemungkinan penyebab tidak adanya korelasi antara TNF dan beratnya penyakit antara lain adalah :

1. Beredarnya sTNFR, reseptor untuk TNF yang telah lepas dari permukaan sel dan larut dalam sirkulasi darah, yang kemudian dapat mengikat TNF di dalam sirkulasi darah dan menetralkan aktivitasnya. Pengukuran kadar TNF dengan metode ELISA tidak hanya mengukur kadar TNF aktif, tetapi juga TNF yang telah terikat kepada reseptor tersebut. Hasil pengukuran menjadi lebih besar, tetapi efek yang diakibatkan tidak lagi sebesar hasil pengukuran. Hal ini dapat dibuktikan dengan bio-assay (Kwiatkowski, *et al.*, 1989b; Hermesen, *et al.*, 1997a). *Soluble TNFR* ini dapat meningkat kadarnya dan tetap dalam serum sampai berhari-hari sesudah penderita diobati (Kern, *et al.*, 1992). Kemungkinan ini dapat berlaku pada penelitian ini, karena pengukuran TNF menggunakan metoda ELISA, dan ini berlaku untuk malaria *falciparum* maupun *vivax*.
2. Penderita-penderita mempunyai sensitivitas yang berbeda terhadap kadar TNF yang sama. Mungkin hal ini disebabkan oleh perbedaan ekspresi reseptor, yang berbeda dari satu organ dengan organ yang lain atau dari satu individu ke individu lain (Ockenhouse, 1992). Efek TNF terhadap organ/sel tergantung kepada jenis dan jumlah TNFR yang diekspresikan pada permukaan sel tersebut. Dalam komplikasi malaria serebral, TNFR2 = p75 sangatlah penting perannya. Hewan yang defisien TNFR2 (*tnfr2null*) terlindung dari komplikasi malaria serebral (Lucas, *et al.*, 1997b).

3. Sensitivitas yang berbeda terhadap kadar TNF yang sama, juga dapat disebabkan keberadaan sitokin-sitokin lain baik yang sinergis maupun yang bersifat inhibitor terhadap TNF, misalnya sitokin anti-radang IL-4, IL-10 dan TGF- β (Kwiatkowski, *et al.*, 1989b; Baptista, *et al.*, 1997; Riley, 1999).
4. Kadar TNF memang tidak konsisten di dalam plasma; dengan adanya stimulasi yang *temporal* (hanya pada waktu parasit berada diluar sel darah merah tepat setelah sizon pecah) dan *clearance* yang cepat menyebabkan terjadinya lonjakan-lonjakan periodik yang diikuti dengan penurunan yang drastis (Kwiatkowski, *et al.*, 1989b; Butcher, *et al.*, 1990; Harpaz, *et al.*, 1992; Karunaweera, *et al.*, 1992). Perbedaan saat pengambilan sampel darah dapat menyebabkan kadar TNF yang terukur menjadi berbeda. Dan efek klinis dari TNF ternyata masih terlihat beberapa waktu setelah kadarnya tidak lagi terdeteksi di dalam plasma (Kwiatkowski, *et al.*, 1989b). Ini terutama terjadi pada gejala yang melibatkan gangguan fungsi organ seperti SGOT, SGPT, kadar ureum dan kreatinin. Sebagaimana dinyatakan oleh Clark and Cowden (1999), gangguan fungsi organ pada malaria dapat diperantarai oleh NO yang pembentukannya dikatalisasi oleh enzim iNOS. Dan sekali diinduksi, enzim ini akan bekerja sampai 24-36 jam. Ini sangat berbeda dengan gejala demam paroksismal pada malaria, yang akan dibicarakan lebih lanjut pada bab 6.3.6.3.

Mungkin masalah inilah yang menyebabkan adanya laporan dan interpretasi yang berbeda-beda tentang peran TNF pada malaria.
5. Adanya faktor lain yang ikut berperan dalam menentukan beratnya gejala klinik selain /disamping TNF misalnya adanya stadium exoeritrositik hipnozoik pada

P. vivax, adanya hemolisis sel darah merah terinfeksi pada waktu sizon matur pecah (yang sangat dipengaruhi oleh derajat parasitemia – ini sangat mungkin terjadi pada gejala demam, sebagaimana hasil analisis pada bab 5.3.3), adanya hemolisis karena respon imun (pembentukan IgG yang melekat pada sel darah merah terinfeksi maupun tidak terinfeksi), atau sebab lain misalnya karena obat dan defisiensi enzim (Manson and Barr, 1985; Melancon-Caplan 1993).

6. Adanya kemungkinan produksi dan akumulasi/konsentrasi TNF di dalam organ sehingga kadar TNF di dalam organ yang terlibat jauh lebih tinggi dari pada kadarnya dalam peredaran darah sistemik pada *P. falciparum*. Ini akan dibahas lebih lanjut.
7. Pada kasus yang terlibat dalam penelitian ini, di mana sebagian besar adalah penderita malaria ringan, TNF dapat saja lebih menunjukkan peran proteksi dari pada patologi. Sebenarnya proses patologi akibat TNF, lebih dikarenakan terjadinya produksi yang berlebihan (Clark and Cowden, 1989). TNF memang merupakan salah satu molekul penting dalam rangkaian respon imun yang menghasilkan efek proteksi pada hospes (Abbas, 1994; Roitt, *et al.*, 1996; Janeway, *et al.*, 1999). Namun analisis pada tabel 5.16 dan 5.17, dengan pemilahan antara malaria ringan dan malaria berat, terutama untuk malaria *vivax*, menunjukkan adanya koefisien korelasi yang lebih besar pada malaria berat dari pada malaria ringan, terutama pada gangguan hati.
8. Adanya kemungkinan pengaruh pengobatan spesifik, misalnya Chloroquin (Picot, *et al.*, 1991; Kwiatkowski dan Bate, 1995; Jeong and Jue, 1997), telah disingkirkan dalam analisis tersendiri. Dalam penelitian tersebut, telah diukur ka-

dar Chloroquin dalam serum penderita-penderita RSU Mataram, dan dalam analisis ternyata, kadar Chloroquin menunjukkan korelasi negatif yang bermakna ($r = -0,396$; $p = 0,004$ dengan $n = 52$) dengan derajat parasitemia, namun tidak menunjukkan korelasi ($r = 0,202$; $p = 0,189$ dengan $n = 44$) dengan kadar TNF dalam serum. Hasil perhitungan statistik di atas dapat dilihat pada lampiran 11.

6.2.3.6.1 Sekuestrasi pada infeksi *P. falciparum* dapat menyebabkan akumulasi atau konsentrasi TNF dalam organ.

Pada infeksi *P. falciparum*, sel darah merah terinfeksi parasit stadium lanjut mengalami sekuestrasi di dalam pembuluh darah kecil di dalam organ-organ sebagaimana diuraikan pada bab 2. Sekuestrasi ini dimungkinkan oleh adanya ekspresi protein-protein tertentu pada permukaan eritrosit yang menyebabkan sel darah merah terinfeksi tersebut dapat melekat kepada molekul adesi yang timbul pada permukaan endotel pembuluh darah sebagai *receptor-ligand* (mengenai hal ini telah banyak dikemukakan dalam bab 2 dengan mengambil malaria serebral sebagai model). Melekatnya sel darah merah terinfeksi kepada dinding kapiler dan vena mengandung keikut-sertaan sel-sel darah yang lain untuk bergerombol di lokasi tersebut. Pada waktu sizon-sizon di dalam sel-sel darah merah yang ter-sekuestrasi tersebut matang dan mengalami desintegrasi bersama sel darah merah hospesnya, keluar sejumlah antigen yang akan merangsang monosit dan makrofag yang berdekatan untuk memproduksi TNF, IL-1, IL-6 dan sejumlah bahan kimia aktif yang lain (Eling and Kremsner, 1994). Oleh karena pecahnya sel darah merah terinfeksi sizon terjadi di dalam organ tempat sekuestrasi, maka konsentrasi TNF di tempat tersebut sangat

mungkin lebih tinggi dari pada dalam peredaran darah, dan efek biologis telah dapat dirasakan ditempat tersebut. Oleh karena itu, dapat dipahami bahwa pada *P. falciparum*, beratnya gangguan organ dapat tidak berkorelasi dengan kadar TNF di dalam peredaran darah sistemik. Dan bila kadar di dalam sirkulasi sistemik ditemukan tinggi seperti pada penelitian ini, ada kemungkinan kadarnya di dalam organ-organ lebih tinggi lagi.

Proses "pooling" atau marginasi yang terjadi pada neutrofil dan makrofag yang memproduksi TNF secara lokal di organ-organ pada proses sekuestrasi, juga telah dilaporkan oleh Clark dan diperkirakan memegang peran utama dalam terjadinya ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) pada malaria (Clark, *et al.*, 1989; Pasvol, 1995).

Analog dengan ini, Jacobs, *et al.*, (1995) melaporkan bahwa pada tikus strain A yang rentan terhadap *P. chabaudi*, kadar NO dalam serum tidak meningkat, namun ekspresi iNOS lokal dalam liver sangat meningkat. Peningkatan ekspresi iNOS dapat diinduksi oleh TNF (Clark, 1991; Jacobs, *et al.*, 1996a; Lancaster, 1992; Moncada, *et al.*, 1991; Rockett, *et al.*, 1992), maka hal ini memperkuat dugaan bahwa produksi TNF lokal dapat jauh lebih tinggi dari pada kadar TNF yang terdeteksi dalam darah perifer. Clark dan Cowden (1999) menyatakan bahwa pada *P. falciparum* selain terjadi produksi sitokin, juga terjadi hipoksia karena sekuestrasi. Sinergi kedua faktor tersebut dapat meningkatkan aktivitas iNOS dalam otak, paru dan ginjal pada malaria. Peningkatan iNOS ini dapat di-deteksi pada monosit dan endotel yang berasal dari ketiga organ tersebut. Peningkatan NO dalam organ-organ yang terlibat ini dapat mengganggu fungsi organ-organ tersebut meskipun kadang konsentrasinya di dalam sirkulasi tidak

meningkat. Berlainan dengan TNF yang bersifat sangat transien, maka sekali iNOS terinduksi, efeknya berlangsung 24-32 jam (Clark, Cowden and Rockett, 1995).

Produksi lokal dari TNF dalam organ juga telah dibuktikan langsung oleh Medana (1997) dengan *in situ hybridization (m-RNA)* dan *immuno histochemistry* pada otak hewan percobaan yang mengalami malaria serebral, dan oleh Udomsangpetch, *et al.* (1997) dalam preparat-preparat otopsi otak manusia yang meninggal karena malaria serebral juga, dan adanya "membrane bound TNF" dalam otak binatang yang mengalami malaria serebral dilaporkan oleh Lucas, *et al.* (1997a)

P. vivax tidak mengalami sekuestrasi dalam pembuluh darah kecil di organ-organ, maka pecahnya sizon dapat terjadi diseluruh sirkulasi sehingga kadar TNF di dalam organ tidak lebih tinggi dari pada dalam sirkulasi umum. Dengan kata lain, pada *P. vivax*, efek TNF di dalam organ dapat diperkirakan dari kadar TNF dalam peredaran darah perifer. Hal ini dibenarkan oleh Clark dan Cowden (1999) yang menyatakan pada *P. vivax*, sitokin-sitokin mempunyai kadar tinggi dalam sirkulasi, tetapi tidak terjadi hipoxia dan akumulasi sitokin lokal dalam organ-organ. Bahwa pada *P. vivax* tidak terjadi sekuestrasi, telah diketahui sejak lama, serta dapat dilihat dari sediaan hapus darah penderita-penderita di mana berbagai stadium dapat ditemukan, sangat berbeda dengan sediaan darah dari penderita *P. falciparum*.

6.2.3.6.2 Anemia dan efek sekuestrasi.

Pada malaria *falciparum*, terjadi sekuestrasi sel darah merah terinfeksi di dalam sungsum tulang, juga terlihat peningkatan jumlah makrofag di antara eritroblas, yang memfagositir pigmen malaria (Schlichterle, *et al.*, 1996). Sekuestrasi ini meningkatkan

kadar TNF dalam sungsum tulang. Dalam hal malaria, tidak hanya TNF yang bersifat men-depres aktivitas sungsum tulang untuk eritropoisis, namun juga adanya deposisi dari pigmen hemozoin, metabolit dari hemoglobin yang keluar pada waktu sizon pecah, yang bersifat racun bagi sel-sel eritrosit muda/eritroblas (Miller, *et al.*, 1989; Arese P - in : Schlichterle, *et al.*, 1996). Adanya diseritropoisis ini juga dibuktikan oleh Clark dan Chaudri (1988) pada tikus yang menderita malaria berat atau tikus dengan infeksi malaria ringan yang disuntik dengan TNF. Pada malaria juga terjadi peningkatan eritrofagositosis, di dalam limpa maupun di dalam sungsum tulang sendiri. Peningkatan eritrofagositosis ini selain dapat dipacu oleh sitokin-sitokin radang termasuk TNF, juga diperani oleh antibodi yang menyebabkan/meningkatkan opsonisasi (Ferante, *et al.*, 1990)

Peran TNF dalam terjadinya anemia memang tidak sebesar pada malaria serebral, ini diperkuat oleh hasil penelitian McGuire, *et al.* (1994) yang menyatakan bahwa tidak ada asosiasi antara kejadian anemia berat pada malaria dengan frekuensi varian homozigot alel TNF2 yang biasanya menyebabkan kecenderungan produksi berlebihan TNF. Sedang pada malaria serebral, asosiasi tersebut lebih besar, apalagi pada penderita malaria serebral yang fatal. Rudin, *et al.* (1997a) juga berpendapat bahwa hubungan anemia dengan TNF tidak sebesar pada malaria serebral. Disamping itu juga ada IL-10 yang menurunkan pengaruh TNF.

Selain itu, ada faktor-faktor lain yang dapat ikut menyebabkan anemia pada malaria, seperti telah diuraikan pada subbab 2.4.2.

Dalam penelitian ini, di mana anemia ditemukan pada 79% penderita, sedang anemia berat hanya ditemukan pada satu orang (tabel 5.5), anemia tidak berkorelasi

dengan derajat parasitemia (tabel 5.10, 5.11, 5.12) maupun kadar TNF (tabel 5.14 dan 5.15) bila ditinjau dari seluruh penderita. Namun pemilahan atas kasus malaria berat dan malaria ringan (tabel 5.16 dan 5.17) menunjukkan bahwa TNF justru mempunyai hubungan positif dengan peningkatan kadar Hb, terutama pada kasus *P. vivax*. Hal ini sulit diterangkan, atau dapat dianggap bahwa peran TNF dikalahkan oleh faktor-faktor lain pada anemia, misalnya efek sitokin IL-1, IL-10, atau faktor eksternal misalnya nutrisi. Pemilahan atas malaria berat dan malaria ringan itu sendiri tidak didasarkan hanya pada derajat anemianya saja, tetapi berdasarkan penjumlahan dari berbagai komponen gejala klinik.

Sedang analisis mengenai korelasi daya hambat serum dengan kadar Hb menunjukkan koefisien yang cukup besar meskipun tidak bermakna ($r = 0,524$; $p = 0,148$) pada *P. falciparum* (tabel 5.26). Ini dapat dimengerti bahwa adanya daya hambat terhadap produksi TNF dapat mengembalikan kadar Hb dengan mengingat peran kontribusi TNF dalam timbulnya anemia seperti diterangkan pada bab 2.4.2. dan lebih menekankan adanya kemungkinan pengaruh sekuestrasi terhadap rendahnya kadar TNF dalam sirkulasi.

6.2.3.6.3 Demam, TNF dan parasit malaria.

Menurut Kwiatkowski, *et al.* (1997) dan beberapa peneliti lain seperti telah dikemukakan pada bab 2, respon demam yang paroksismal pada malaria merupakan hasil induksi produksi TNF, yang merupakan respon primer (tidak memerlukan peran sel T seperti pada malaria serebral), yang merangsang pusat suhu dan berkaitan dengan sifat labil dari TNF yang cepat menghilang, sehingga suhu juga naik - turun

dengan cepat. Ini juga terjadi pada *P. vivax* dan telah dibuktikan oleh Butcher, *et al.* (1990) dan Karunaweera, *et al.* (1992b). Butcher mengamati pada penderita –penderita malaria *vivax* bahwa puncak kadar TNF timbul bersamaan dengan penampilan mayoritas bentuk cincin pada sediaan hapusan darah penderita. Sedang penelitian dilaboratorium oleh Kwiatkowski, *et al.* (1989b) dilakukan pada biakan bareng monosit dengan *P. falciparum* (gambar 2.8).

Berdasarkan analisis pada bab 6.3.3 ternyata baik pada *P. falciparum* maupun *P. vivax*, peran langsung dari parasit juga penting dalam terjadinya gejala demam ini. Hal ini dapat diterangkan dengan hasil penelitian Kubata, *et al.* (1998) bahwa homogenat dari kultur *P. falciparum*, dapat memproduksi Prostaglandin yang bersifat pirogenik. Pada keadaan *in vivo*, mungkin Prostaglandin yang terbebas pada waktu sizon pecah merangsang pusat suhu. Prostaglandin ini juga merupakan senyawa yang labil.

Dalam kelompok malaria berat juga ada dua kasus hyperpireksia dimana kadar TNF tidak terlalu tinggi. Hal ini juga menyokong pendapat peran parasit langsung terhadap pusat suhu tanpa melalui TNF sebagai mediator, diperkuat analisis pada tabel 5.14 dan 5.15 yang menyatakan tidak ditemukan korelasi antara demam dan kadar TNF.

Dari uraian Kapas, Shibata dan Krueger (1995) diketahui bahwa TNF dalam perannya merangsang pusat suhu, juga menggunakan Prostaglandin sebagai mediator. Telah diketahui bahwa TNF memang dapat menstimulir pembentukan PGI₂ dan PGE₂ (Dinarello, 1990). Maka kedua faktor, TNF dan parasit sendiri, ternyata melewati jalur yang sama dalam mewujudkan efeknya menimbulkan demam. Hanya saja harus

diperhatikan adanya tenggang waktu antara munculnya TNF dalam darah dan timbulnya efek peningkatan suhu, seperti yang bisa dipelajari dari percobaan Karunaweera (gambar 2.3). Pengetahuan mengenai peran TNF dalam timbulnya demam ini telah dimanfaatkan oleh Karunaweera dengan penggunaan antibodi monoklonal terhadap TNF untuk pengobatan pada anak-anak penderita malaria di Gambia, dan ternyata dapat menurunkan panas dengan kecepatan sesuai dengan dosis anti-TNF yang digunakan (Karunaweera, *et al.*, 1992; Kwiatkowski, *et al.*, 1993).

Sebenarnya respon peningkatan suhu ini, sama dengan produksi TNF sendiri, mempunyai tujuan protektif, yaitu pengendalian populasi parasit. Hal ini dimungkinkan karena suhu tinggi berakibat peningkatan fungsi sel-sel imunokompeten serta dan secara langsung juga mengurangi pertumbuhan mikroorganisme termasuk parasit malaria (Kuby, 1992; Kwiatkowski 1995; Kwiatkowski, *et al.*, 1997). Penelitian Higuchi, *et al.*, (1991) menyatakan, adanya peningkatan suhu akan sangat meningkatkan fungsi sitotoksik dari TNF sendiri.

6.2.3.6.4 Gangguan fungsi hati pada malaria.

Gangguan fungsi hati pada malaria, selain karena adanya stadium pre-eritrositik juga dapat disebabkan oleh adanya bentuk-bentuk hipnozoit di dalam sel hepar yang ditemui pada *P. vivax* dan tidak ada pada *P. falciparum* (Druilhe, Renia and Fidock., 1995). Keberadaan bentuk pre-eritrositik dan hipnozoit dalam hepar ini memungkinkan:

1. Adanya kerusakan sel hepar yang dihuni oleh hipnozoit karena proses pertumbuhan parasit.

2. Stimulasi produksi TNF lokal oleh sel Kupfer yang dapat merangsang sel-sel hepar disekitarnya dan mengaktifkan produksi NO (*nitric oxide*) di dalam sel hati sendiri karena di dalam sel hati tersedia enzim khusus untuk itu (iNOS = inducible nitric oxide synthase), dan menyebabkan proses "*suicide*" (Lancaster 1992) yang merusak diri sendiri, atau yang lebih tepat disebut "pengorbanan diri" agar parasit yang ada di dalam sel itu juga mati.
3. Adanya kemungkinan timbulnya respon pembentukan IFN- γ terhadap bentuk exoeritrositik sebagaimana dikemukakan oleh Schlichterle (1996), dan IFN- γ disamping dapat menggiatkan produksi TNF oleh sel Kupfer juga secara langsung menstimulir produksi NO (Moncada, Palmer and Hicks, 1991).
4. Adanya respon imun seluler dengan pengaktifan sel T sitotoksik terhadap parasit intraseluler di dalam hepatosit (Dieye, *et al.*, 1997; Schlichterle, 1996).

Perlu juga diingat bahwa pada infeksi *P. vivax*, di mana indeks multiplikasi dari bentuk aseksual dalam peredaran darah tidak setinggi *P. falciparum*, ditambah adanya keterbatasan jenis eritrosit yang dipilih sebagai hospes (White, 1998) maka apabila ditemukan derajat parasitemia yang tinggi di dalam peredaran darah, itu berarti bahwa bentuk hulunya, yaitu bentuk ekso-eritrositik di dalam hepar, mempunyai kuantitas yang tinggi juga. Jadi dapat dimengerti adanya kerusakan yang luas di dalam hepar bila derajat parasitemia tinggi seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.12.

6.3 Pembahasan Hasil Penelitian Bagian Kedua.

6.3.1.1 Korelasi besarnya daya hambat produksi TNF pada stimulasi dua antigen yang berbeda.

Adanya korelasi besarnya daya hambat produksi TNF pada serum-serum dari penderita, yang diukur secara *in vitro* dengan stimulasi produksi TNF oleh antigen berbeda seperti yang ditunjukkan pada bab 5.5.1, menunjukkan adanya reaksi silang diantara kedua antigen, yaitu galur-galur yang berasal dari Lombok sendiri (Lo-2) dan galur yang berasal dari Irian Jaya (G-2300). Hal ini dapat mempunyai arti penting, yaitu bila daya hambat yang terukur ini memang merupakan antibodi yang dapat mencegah timbulnya gejala klinik malaria, maka respon imun dari penderita yang berasal dari Lombok, juga akan dapat menghindarkan penderita ini dari gejala klinik malaria yang ditimbulkan oleh infeksi dari galur yang berasal dari Irian Jaya. Penelitian ini dapat diperluas dengan galur-galur yang berasal dari daerah lain. Dengan mengingat adanya keanekaragaman hayati di Indonesia, maka adanya respon silang dapat menguntungkan. Adanya *strain-* dan *species-cross reactivity* juga telah dilaporkan oleh Bate dan Taverne (Bate, *et al.*, 1990; 1992b; 1994b; 1994c; Taverne, *et al.*, 1990b, 1990c). Kurangnya spesifisitas ini dapat saja dihubungkan dengan kemungkinan antigen malaria yang menstimulir TNF yang termasuk golongan antigen *T-independent* dapat menghasilkan aktivasi sel B poliklonal sehingga dihasilkan IgM yang kurang spesifik (Janeway, *et al.*, 1999; Roitt, *et al.*, 1996). Sebagaimana dinyatakan pada bab 2.5, Bate dan kelompoknya, mengidentifikasi

antigen yang terlibat dalam stimulasi TNF sebagai suatu fosfolipid, dan Schofield, *et al.* (1993a; 1993b; 1994) mengidentifikasinya sebagai suatu inositol-glikosil-fosfatidil.

6.3.1.2 Perbandingan daya hambat produksi TNF serum penderita dari RSU dan Puskesmas.

Serum penderita RSU menunjukkan daya hambat produksi TNF lebih tinggi dari pada penderita Puskesmas, meski perbedaan tersebut tidak bermakna. Lebih tingginya daya hambat sampel RSU, mungkin disebabkan jarak waktu pengambilan spesimen di RSU lebih singkat, sehingga kurva masih berada dalam fase peningkatan. Sedang pada penderita Puskesmas, sampel-sampel pada masa konvalesen menunjukkan daya hambat rendah. Hal ini dipastikan dengan melihat kurva fluktuasi pada gambar 5.4.

6.3.1.3 Kurva daya hambat produksi TNF dalam serum penderita.

Kurva dari penderita-penderita dari Puskesmas pada gambar 5.2 dan 5.3 terlihat bahwa sampai minggu keempat, belum semua garis kurve menunjukkan penurunan, baru pada minggu ketujuh kurve daya hambat seluruhnya menurun.

Adanya penurunan daya hambat pada minggu ketujuh seperti yang terjadi pada sampel Puskesmas menunjukkan bahwa daya hambat tersebut bersifat transien atau berumur singkat, maka ada kemungkinan merupakan IgM. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Bate *et al.*, (1994) pada dua orang penderitanya, dan telah dianalisis secara luas pada binatang percobaan (Bate 1989, Bate, *et al.*, 1994a; Taverne, *et al.*, 1990a, 1990b, 1990c).

Namun pada penelitian Bate tersebut, penderita-penderita langsung diobati sehingga parasit cepat menghilang, berarti stimulasi antigen otomatis berhenti. Sedang pada penelitian ini, beberapa penderita masih menunjukkan parasit di dalam sediaan darahnya. Namun dalam analisis, ternyata tidak ada perbedaan besarnya daya hambat serum penderita yang masih mengandung parasit pada pengambilan sampel terakhir maupun yang tidak mengandung parasit lagi. Tetapi ada seorang penderita *P. falciparum* dari Puskesmas, yang telah menunjukkan penurunan daya hambat serumnya pada pemeriksaan terakhir (sampel ketiga), ternyata daya hambat tersebut meningkat kembali sejalan dengan adanya infeksi baru dengan *P. vivax*. Secara teoritis, respon IgM memang tidak bertahan lama setelah pemberian antigen, tetapi adanya infeksi baru atau infeksi yang bertahan lama, dapat merangsang produksi antibodi.

Apabila daya hambat dalam serum penderita malaria dalam penelitian ini memang merupakan IgM seperti yang dikemukakan oleh Bate dan Playfair (lihat bab 2.5), maka isotip ini memang lebih cepat terdeteksi di dalam serum, namun juga lebih cepat menghilang. Janeway, *et al.* (1999) menyatakan, bahwa antigen tipe T-12 dapat merangsang respon pembentukan antibodi IgM dalam waktu 48 jam. Krisna Ray, dengan menggunakan IIFT (*indirect immunofluorescent test*) dengan antigen stadium sizon, telah dapat mendeteksi IgM tersebut pada hari pertama penderita mengalami panas, diikuti dengan peningkatan titer pada hari-hari berikutnya (Ray, *et al.*, 1992). Dinyatakan, bahwa deteksi IgM merupakan pertanda *recent infection* dan mungkin dapat menjadi metoda diagnosis alternatif. Namun perlu diteliti, apakah antibodi yang

terdeteksi oleh Ray dalam IIFT tersebut, sama dengan "*inhibitory antibody*" yang diteliti oleh Bate dan kawan-kawan.

Kremsner, *et al.* (1989b) menyatakan bahwa IgM ditemukan pada penderita malaria, dan kadar IgM pada penderita semi-imun tidak berbeda dengan kadar IgM pada kontrol. Sedang pada penderita non-imun, kadar IgM meningkat pada hari pertama (day 0) dan hari ke 5 MRS, dan kadarnya rendah pada hari ke 28. Namun kemungkinan besar IgM yang diukur bukan IgM spesifik.

Kurva seperti di atas tampaknya sesuai dengan gambaran respon imun dari sebuah daerah dengan tingkat endemisitas rendah. Tingkat transmisi yang rendah menyebabkan tidak adanya re-infeksi yang menyebabkan "boosting", sehingga kadar antibodi IgM akan menurun kembali dalam 6 – 7 minggu.

6.3.1.4 Perbandingan daya hambat produksi TNF dari serum penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* .

Pada konsentrasi serum 5% ini, harga rata-rata daya hambat serum pada penderita infeksi *P. falciparum* lebih rendah dari pada harga rata-rata daya hambat serum penderita infeksi *P. vivax* (tabel 5.23).

Hasil penelitian ini agak berbeda bila dibandingkan dengan perolehan Bate, *et al* (1992b), yang membuktikan tidak ada perbedaan inhibisi yang dihasilkan oleh antiserum dari tikus yang diimunisasi dengan masing-masing *P. vivax*, *P. falciparum* dan *P. yoelii* terhadap produksi TNF pada kultur monosit yang distimulir dengan exo-antigen dari ketiga spesies. Namun dalam penelitian itu, Bate menggunakan antisera yang berasal dari tikus yang diimunisasi dengan exo-antigen yang berasal dari

supernatan biakan Bate sendiri telah membuktikan, bahwa antiserum ini lebih efektif dari pada serum hiperimun dalam percobaannya.

Perbedaan daya hambat antara serum penderita kedua macam malaria ini juga agak berbeda dengan harapan yang diperoleh dengan adanya korelasi daya hambat terhadap dua galur antigen seperti telah disampaikan di atas. Oleh karena itu sangat diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memastikan hal ini.

Bahwa daya hambat serum pada penderita *P. falciparum* lebih kecil, mengundang pertanyaan apakah hal ini disebabkan oleh adanya proses sekuestrasi, yang menyebabkan pembentukan kompleks imun di lokasi antigen pertama keluar dari sel darah merah yang menyebabkan kadar antibodi dalam sirkulasi menurun.

Deposisi dari IgM di dalam organ tempat sekuestrasi juga telah dibuktikan oleh Aikawa (1988) pada preparat-preparat autopsi dari penderita malaria serebral dari Burma. Aikawa juga mengingatkan, bahwa untuk pembuatan vaksin anti-malaria, sebaiknya juga dievaluasi efeknya terhadap daya sekuestrasi dari parasit.

6.3.2 Analisis korelasi antara besarnya daya hambat produksi TNF dalam serum penderita dengan penurunan gejala klinik malaria.

6.3.2.1 Daya hambat produksi TNF dalam serum penderita malaria berat dan malaria ringan.

Dari tabel 5.25 terlihat bahwa meskipun tidak bermakna, daya hambat dari serum penderita malaria berat lebih tinggi dari pada penderita malaria ringan. Hal ini dapat berarti :

1. Secara tidak langsung menunjukkan bahwa antigen yang dikandung oleh penderita malaria berat cukup potensial untuk merangsang timbulnya produksi TNF yang dapat memperantarai timbulnya gejala klinik, serta merangsang timbulnya respon daya hambat yang tinggi.
2. Penderita malaria berat berusaha keras mengatasi produksi TNF yang berlebihan (yang merugikan) dengan meningkatkan daya hambat terhadap stimulasi produksi TNF tersebut.
3. Tetapi bisa juga berarti bahwa dengan masih beredarnya *blocking antibody* dalam jumlah besar di dalam sirkulasi, produksi TNF di dalam organ tidak ada yang mengendalikan sehingga terjadi gejala klinik malaria berat.

6.3.2.2 Korelasi antara besarnya daya hambat serum terhadap produksi TNF yang diukur secara *in vitro* dengan kadar TNF dalam serum.

Dari tabel 5.7 diketahui bahwa korelasi tersebut bertanda negatif namun kecil pada *P. falciparum*, dan besar serta sangat bermakna pada *P. vivax* ($r = -1,000$; $p = 0,01$). Meskipun pada *P. vivax*, jumlah sampel yang dapat dianalisis hanya 4, namun ini dapat menjadi awal dari pembenaran tidak adanya pengaruh sekuestrasi pada *P. vivax*, sehingga timbulnya respon daya hambat langsung dapat menurunkan kadar TNF.

6.3.2.3 Korelasi daya hambat produksi TNF dengan parameter gejala klinik .

Pada penderita *P. falciparum* (tabel 5.26) terlihat hubungan sebagai berikut :

1. Koefisien korelasi dan derajat kemaknaan yang tidak konsisten, yang sejalan

dengan dugaan pengaruh sekuestrasi.

2. Adanya korelasi positif yang bermakna dengan SGOT, yang sulit dijelaskan.
3. Untuk gejala demam, adanya korelasi negatif, meskipun tidak signifikan, menunjukkan bahwa TNF dapat mempunyai partisipasi juga dalam timbulnya gejala demam (di samping efek parasit langsung seperti telah dianalisis sebelumnya), sehingga timbulnya respon penghambat produksi TNF dapat mengurangi gejala demam. Ini berarti, timbulnya respon penghambat, dapat mencegah parasit untuk akses kepada pusat suhu, dan juga dapat memblokir parasit untuk merangsang produksi TNF pada sel monosit. Demikian juga untuk gejala anemia, daya hambat produksi TNF dapat mengakibatkan Hb meningkat kembali.

Pada penderita *P. vivax* (tabel 5.27) :

1. Terlihat korelasi dengan arah negatif semua. Dan bila dilihat masing-masing koefisien korelasinya, meskipun tidak menunjukkan nilai signifikan, namun hampir semua menunjukkan derajat korelasi yang lebih besar dari pada pada *P. falciparum*, kecuali pada kadar Hb.
2. Korelasi yang negatif menunjukkan bahwa daya hambat serum penderita menunjukkan efek mengurangi gejala klinik. Maka sekali lagi, hal ini dapat menunjukkan bahwa pada *P. vivax*, baik TNF maupun antibodi yang menghambat produksinya, berada secara merata di dalam sirkulasi maupun di dalam organ, sehingga efeknya terhadap organ bisa di estimasi dari peredaran darah tepi.

6.4.1 Keberhasilan Uji Hipotesis.

Dari hasil penelitian yang telah dibahas tersebut, dapat dirumuskan keberhasilan penelitian dalam menguji hipotesis yang telah disusun, sebagai berikut :

1. Uji korelasi antara derajat parasitemia dengan beratnya gejala klinik malaria pada seluruh penderita malaria di RSUD Mataram, menghasilkan korelasi bermakna hanya pada gejala klinik demam. Oleh karena itu, dicoba untuk memilah penderita dalam kelompok berdasarkan spesies penyebab.

Ternyata pada penderita malaria *falciparum*, korelasi antara derajat parasitemia dan gejala klinik juga hanya ditemukan pada gejala klinik demam. Untuk gejala klinik yang lain, terlihat koefisien korelasi yang sangat kecil.

Sedang pada malaria *vivax*, korelasi bermakna juga hanya ditemukan pada gejala klinik demam, meskipun untuk gejala klinik yang lain ditemukan koefisien korelasi yang lebih besar dari pada malaria *falciparum*, bahkan korelasi tersebut mendekati bermakna pada gejala gangguan fungsi hati SGPT (dan bilirubin).

Tidak adanya korelasi antara derajat parasitemia dan gejala klinik tersebut terutama pada malaria *falciparum*, mungkin disebabkan adanya faktor lain disamping efek jumlah parasit, antara lain : efek dari mediator yaitu TNF, dan adanya proses sekuestrasi sebagai akibatnya.

Pada penderita – penderita malaria di RSUD tersebut ditemukan kadar TNF yang tinggi. Kadar TNF rata-rata pada penderita – penderita ini cukup tinggi bila dibandingkan dengan daerah endemik lain. Hal ini sejalan dengan tingginya kadar TNF pada penderita non-imun atau semi-imun.

Ditambah adanya kenyataan bahwa :

- a. penderita-penderita di RSUD tersebut merupakan orang dewasa,
- b. adanya informasi dan data pada tahun sebelumnya bahwa prevalensi malaria pada anak-anak lebih rendah dari pada orang dewasa,
- c. respon antibodi terhadap RESA yang tidak mencapai tingkat protektif,

maka tampaknya data ini sesuai dengan keadaan daerah hipo-endemik di mana tingkat paparan yang rendah tidak menimbulkan imunitas yang dapat menurunkan kadar TNF dan gejala klinik (Tharavanij, *et al.*, 1984; Fribourgh-Blanc, *et al.*, 1985; Baird, *et al.*, 1998; Riley, 1999).

2. Terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,017$) antara kadar rata-rata TNF pada penderita *P. falciparum* dan *P. vivax*, yaitu 309,77 pg/ml pada *P. falciparum* dan 119,02 pg/ml pada *P. vivax*. Kadar yang berbeda pada kedua macam malaria ini mungkin disebabkan perbedaan kemampuan kedua spesies parasit dalam merangsang produksi TNF pada monosit-makrofag penderita. Perbedaan kadar ini dapat saja berakibat perbedaan besarnya pengaruhnya.
3. Kadar TNF tersebut tidak berkorelasi dengan derajat parasitemia baik pada *P. falciparum* maupun *P. vivax*.

Hal ini mungkin disebabkan adanya akumulasi kadar TNF di dalam organ karena sekuestrasi pada *P. falciparum*, atau disebabkan kadar TNF yang berfluktuasi, sedangkan derajat parasitemia tidak berfluktuasi pada *P. vivax*.

4. Kadar rata-rata TNF pada penderita malaria berat (407,80 pg/ml) lebih tinggi dari pada penderita malaria ringan (211,40 pg/ml), meskipun perbedaannya tidak bermakna ($p = 0,226$). Hal ini sesuai dengan sebagian besar laporan peneliti lain.

Namun tingginya kadar TNF tersebut pada penderita malaria *falciparum* tidak berkorelasi dengan gejala klinik demam, anemia, gangguan fungsi hati dan gangguan fungsi ginjal.

Sedang pada penderita malaria *vivax*, terdapat korelasi bermakna antara kadar TNF dengan gangguan fungsi hati, dan koefisien korelasi dengan gangguan fungsi ginjal menunjukkan angka yang lebih besar dari pada malaria *falciparum*. Kecilnya korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik pada malaria *falciparum* dapat dihubungkan dengan sekuestrasi yang menyebabkan akumulasi TNF dalam organ.

5. Di dalam serum penderita malaria di Lombok ini ditemukan faktor yang mempunyai daya hambat terhadap produksi TNF secara *in vitro*. Aktivitas daya hambat menurun pada masa konvalesen. Kurve daya hambat produksi TNF ini serupa dengan kurve *blocking antibody* yang merupakan IgM dan bersifat transien yang dilaporkan oleh Bate dan kawan-kawanya seperti disebutkan sebelumnya. Kurve ini juga sesuai dengan daerah dengan endemisitas rendah.
6. Besarnya daya hambat dalam serum penderita malaria *falciparum* lebih rendah dari pada penderita malaria *vivax*. Hal ini mungkin disebabkan terjadinya imun kompleks di dalam organ tempat sekuestrasi sehingga kadar antibodi di dalam sirkulasi berkurang pada malaria *falciparum*.
7. Masing-masing serum penderita, tidak menunjukkan perbedaan daya hambat produksi TNF terhadap stimulasi dengan antigen dari dua galur berbeda. Ini mungkin disebabkan adanya spesifitas yang rendah dari IgM antibodi yang dihasilkan pada rangsangan antigen malaria ini.

8. Besarnya daya hambat produksi TNF tersebut pada penderita malaria *falciparum* tidak berkorelasi dengan penurunan kadar TNF, tetapi pada penderita malaria *vivax* menunjukkan korelasi bermakna dengan penurunan kadar TNF. Tidak adanya korelasi pada malaria *falciparum* tersebut dapat disebabkan kadar TNF yang berfluktuasi ataupun oleh pengaruh sekuestrasi, baik terhadap kadar TNF dalam sirkulasi maupun kadar antibodi yang terukur sebagai daya hambat produksi TNF.
9. Besarnya daya hambat produksi TNF tersebut pada penderita malaria *falciparum* tidak berkorelasi dengan penurunan beratnya gejala klinik. Penderita malaria *vivax* menunjukkan korelasi yang hampir bermakna antara besarnya daya hambat terhadap produksi TNF dengan kadar SGOT, dan, meskipun tidak bermakna, koefisien korelasi dengan komponen gejala klinik yang lain menunjukkan angka yang konsisten negatif dan lebih besar dari pada pada penderita malaria *falciparum*. Kecuali pada gejala anemia, terdapat korelasi positif antara daya hambat serum dengan kadar Hb pada *P. falciparum*, yang dapat diartikan bahwa timbulnya daya hambat produksi TNF dapat menghindarkan penderita dari anemia.

Keberhasilan uji tersebut dirangkumkan dalam tabel pada halaman berikut.

Tabel 6.2 Rangkuman keberhasilan uji hipotesis.

Nomor	Hipotesis	Penderita malaria <i>falciparum</i>	Penderita malaria <i>vivax</i>
1	Terdapat korelasi antara derajat parasitemia dengan gejala klinik	a. terbukti pada gejala demam b. tidak terbukti pada gejala lain	a. terbukti pada gejala demam b. tidak terbukti pada gejala lain
2	Kadar TNF berbeda antara malaria <i>falciparum</i> dan malaria <i>vivax</i> : terbukti.		
3	Terdapat korelasi antara kadar TNF dengan derajat parasitemia.	Tidak terbukti	Tidak terbukti
4	Terdapat korelasi antara kadar TNF dengan gejala klinik.	Tidak terbukti	Berkorelasi dengan gangguan fungsi hati
5	Serum penderita mempunyai daya hambat terhadap produksi TNF	Terbukti	Terbukti
6	Daya hambat serum penderita malaria <i>falciparum</i> berbeda dengan serum penderita malaria <i>vivax</i>	Daya hambat serum penderita malaria <i>falciparum</i> lebih rendah dari pada penderita malaria <i>vivax</i>	
7	Daya hambat terhadap dua antigen tidak berbeda	Terbukti	Terbukti
8	Korelasi daya hambat dengan penurunan kadar TNF	Tidak terbukti	Terbukti
9	Korelasi daya hambat dengan penurunan gejala klinik	Tidak terbukti (terbukti pada anemia - NS)	Koefisien korelasi yang konsisten meskipun tidak bermakna

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN :

1. Pada penderita malaria *falciparum* dan malaria *vivax* di daerah hipomesoendemik Lombok, korelasi antara derajat parasitemia dengan beratnya gejala klinik hanya ditemukan pada gejala demam. Sedang untuk gejala klinik anemia, gangguan fungsi hati dan gangguan fungsi ginjal, tidak terdapat korelasi dengan derajat parasitemia.
2. Pada penderita-penderita malaria tersebut, ditemukan kadar TNF yang tinggi, yaitu antara 0 dan 3057 pg/ml dengan rata-rata 256,72 pg/ml. Kadar TNF ternyata lebih tinggi pada penderita malaria *falciparum* dari pada penderita malaria *vivax* ($p = 0,017$).
3. Kadar TNF pada penderita-penderita tersebut tidak menunjukkan korelasi dengan derajat parasitemia pada penderita malaria *falciparum* maupun malaria *vivax*.
4. Pada penderita malaria *falciparum*, kadar TNF tidak menunjukkan korelasi dengan beratnya gejala klinik demam, anemia, gangguan fungsi hati dan gangguan fungsi ginjal. Sedang pada penderita malaria *vivax*, kadar TNF menunjukkan korelasi bermakna pada gangguan fungsi hati dan secara umum menunjukkan koefisien korelasi yang lebih besar dengan gejala klinik dari pada malaria *falciparum*.

5. Serum penderita - penderita malaria di daerah hipo-mesoendemik Lombok mempunyai daya hambat terhadap produksi TNF. Daya hambat tersebut sangat menurun pada serum pada masa konvalesen (minggu ketujuh).
6. Besarnya daya hambat serum penderita malaria *falciparum* lebih rendah secara bermakna dari pada daya hambat serum penderita malaria *vivax*.
7. Serum penderita-penderita malaria ini tidak menunjukkan perbedaan besarnya daya hambat terhadap stimulasi produksi TNF dengan antigen *P. falciparum* yang berasal dari Lombok dan Irian Jaya.
8. Besarnya daya hambat tersebut tidak berkorelasi dengan penurunan kadar TNF dalam serum pada penderita malaria *falciparum*, tetapi berkorelasi sangat bermakna dengan penurunan kadar TNF dalam serum pada penderita malaria *vivax*.
9. Besarnya daya hambat dalam serum penderita malaria *falciparum* menunjukkan korelasi yang tidak konsisten dengan penurunan gejala klinik, sedang pada penderita malaria *vivax*, besarnya daya hambat meskipun tidak menunjukkan korelasi yang bermakna, tetapi menunjukkan arah yang konsisten dengan penurunan semua komponen gejala klinik.

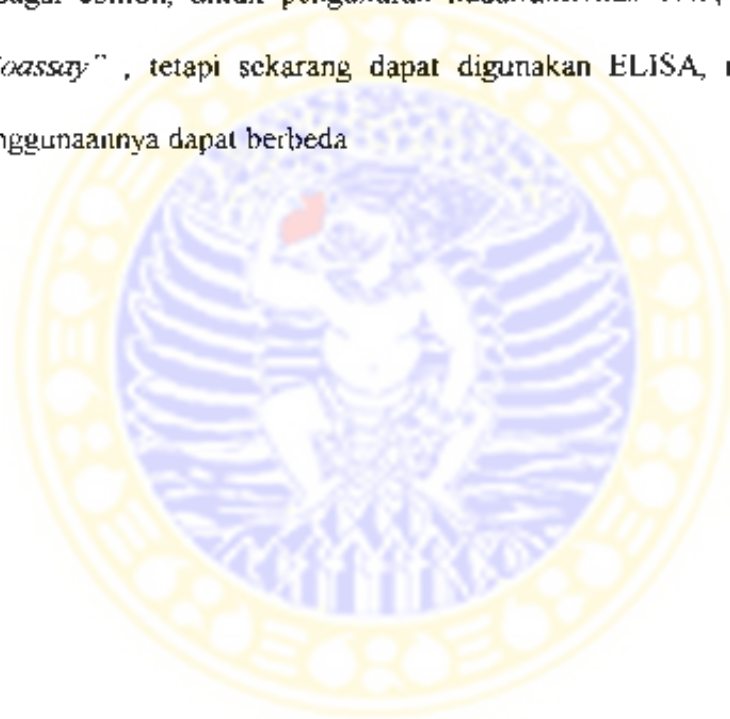
SARAN :

1. Oleh karena hasil penelitian ini berbeda dengan pendapat sebagian peneliti lain yang menyatakan adanya hubungan antara TNF dengan gejala malaria

terutama pada malaria falciparum, maka perlu diadakan konfirmasi, antara lain dalam hal :

- a. Perluasan volume penelitian yang sama, yaitu dengan menambah jumlah sampel baik untuk penderita *malaria falciparum* maupun *vivax*.
 - b. Konfirmasi pengaruh sekuestrasi, antara lain dengan penelitian eksperimental pada hewan percobaan.
- 2 Perlu perluasan penelitian ke daerah endemik tinggi guna memastikan eksistensi faktor penghambat produksi TNF. Benarkah faktor ini juga ditemukan pada penderita-penderita yang imun? Apakah pada penderita-penderita ini faktor tersebut bertahan lama di dalam serum, sehingga penderita tidak menunjukkan gejala?
 - 3 Selanjutnya perlu analisis lebih jauh dari faktor penghambat produksi TNF tersebut, benarkah merupakan antibodi dari fraksi IgM ataukah ada faktor lain.
 - 4 Dengan mengingat hasil percobaan Bate et al (1993) pada tikus bahwa fosfolipid yang di-“coupling” dengan protein karier dapat menghasilkan *blocking antibody* yang berbentuk IgG yang dapat bertahan lebih lama, maka perlu diadakan studi dan riset ke arah sana.
 - 5 Dengan identifikasi dan pemurnian antigen, ataupun penggunaan adjuvan yang tepat tentunya dapat menghasilkan “*anti-disease immunity*” yang dicita-citakan.
 - 6 Bagi para peneliti lain yang akan melakukan penelitian di bidang yang sama, dianjurkan untuk antara lain :

- a Memastikan pemilihan saat yang tepat dalam hal pengambilan sampel darah penderita sehubungan dengan cepatnya waktu *clearance* dari TNF.
- b Mencari teknik yang lebih sederhana dalam pengukuran aktivitas daya hambat produksi TNF dalam serum penderita. Penggunaan sistim biologik sebagai alat ukur dalam penelitian ini sangat menghabiskan waktu dan tenaga di samping akurasi yang kurang karena adanya variasi biologik. Sebagai contoh, untuk pengukuran kadar/aktivitas TNF, dulu digunakan “*bioassay*” , tetapi sekarang dapat digunakan ELISA, meskipun tujuan penggunaannya dapat berbeda



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Poher JS, 1994. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Agus Soetanto, 2000. *Malaria control in West Nusa Tenggara Province*. In: *Tropical Disease Center Meeting for Malaria Control in Lombok and Sumbawa Island*. Surabaya, March 7-8, 2000.
- Aikawa M, 1977. *Variation in structure and function during the life cycle of malaria parasites*. Bull WHO 55(2-3) 139-56.
- Aikawa M, 1988. *Human cerebral malaria*. Am J Trop Med Hyg 39(1):3-10.
- Allan RJ, Beattie P, Bate C, Van Hensbroek MB, Morris-Jones S, Greenwood BM, Kwiatkowski D, 1995. *Strain variation in Tumor Necrosis Factor induction by parasite from children with acute falciparum malaria*. Infect Immun 63(4):1173-1175.
- Allan RJ, Rowe A, Kwiatkowski D, 1993. *Plasmodium falciparum varies in its ability to induce Tumor Necrosis Factor*. Infect Immun 61:4772-76.
- Amran Ibrahim, 1997. *Studi penilaian efikasi Klorokuin pada malaria falciparum tanpa komplikasi di 3 propinsi (Jawa Tengah, DI Yogyakarta, NTT)*. Seminar Parasitologi Nasional, Surabaya 21 Nopember 1997.
- Anders RF, 1988. *Antigens of Plasmodium falciparum and their potential as components of a malaria vaccine*. In : Englund PT, Sher A, eds. *Biology of parasitism* New York: Allan R. Liss Inc. pp 201-24
- Andi, 1997. *Panduan lengkap SPSS for Windows 6.0*. Penerbit Andi, Yogyakarta, hal 259-76.
- Anonim a, 1999. *KLB di Lombok*. Jawa Pos 29 Juli 1999
- Anonim b, 1999. *Malaria di Jawa Tengah : Kulon Progo*. Jawa Pos 19 Agustus 1999
- Anonim c, 1999. *Di Jawa Timur, kasus malaria sangat meningkat*. Surabaya Post 4 September 1999.
- Baird JK, Basri H, Jones TR, Purnomo, Bangs MJ, Ritonga A, 1991a. *Resistance to antimalarials by Plasmodium falciparum in Arso PIR, Irian Jaya, Indonesia*. Am J Trop Med Hyg 44(6):640-4.

- Baird JK, Basri H, Purnomo, Bangs MJ, Subianto B, Patchen LC, Hoffman SL, 1991b. Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 44(5):547-52.
- Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S, 1991c. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45(1):65-76
- Baird JK, Masbar S, Basri H, Tirtokusumo S, Subianto B, Hoffman SL, 1998. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Infectious Diseases* 178:592-5.
- Baird JK, Purnomo, Basri H, Bangs MJ, Andersen EM, Jones TR, Masbar S, Harjosuwarno S, Subianto B, Arbani PR, 1993. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 49:707-19.
- Baptista JL, Vanham G, Wery M, Van Marck E, 1997. Cytokine levels during mild and cerebral *falciparum* malaria in children living in a mesoendemic area. *Trop Med Int Hlth* 2(7):673-9.
- Baskoro A dan Boediwarsono, 1997. Malaria tropika pada seorang penderita sindroma dismiclopoesis. *Acta Med Indon* 29(3):215-22.
- Bate CAW and Kwiatkowski D, 1994a. Stimulators of Tumor Necrosis Factor production released by damaged erythrocytes. *Immunol* 83:256-61.
- Bate CAW and Kwiatkowski D, 1994b. Inhibitory immunoglobulin M antibodies to Tumor Necrosis Factor-inducing toxins in patients with malaria. *Infect Immun* 62(8):3086-91.
- Bate CAW and Kwiatkowski D, 1994c. A monoclonal antibody that recognizes phosphatidylinositol inhibits induction of Tumor Necrosis Factor alpha by different strains of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 62(12):5261-5266.
- Bate CAW, Taverne J, Bootsma HJ, Mason RCSI, Skalko N, Gregoriadis G, Playfair JHL, 1992a. Antibodies against phosphatidyl inositol and inositol monophosphate specifically inhibit TNF induction by malaria exoantigens. *Immunol* 76:35-41.
- Bate CAW, Taverne J, Dave A, Playfair DHL, 1990. Malaria exoantigens induce T-independent antibody that blocks their ability to induce TNF. *Immunol* 70:315-20.

- Bate CAW, Taverne J, Karunaweera ND, Mendis KN, Kwiatkowski D, Playfair JHL, 1992b. Serological relationship of TNF-inducing exoantigens of *P. falciparum* and *P. vivax*. *Infect Immun* 60(3):1241-3.
- Bate CAW, Taverne J, Kwiatkowski D, Playfair JHL, 1993. Phospholipids coupled to a carrier induce IgG antibody that blocks TNF induction by toxic malaria antigens. *Immunol* 79:138-45.
- Bate CAW, Taverne J and Playfair JHL, 1988. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunol* 64:227-31.
- Bate CAW, Taverne J and Playfair JHL, 1989. Soluble malarial antigens are toxic and induce the production of tumor necrosis factor in vivo. *Immunol* 66:600-5.
- Bate CAW, Taverne J and Playfair JHL, 1992. Detoxified exoantigens and phosphatidyl inositol derivatives inhibit TNF induction by malarial exoantigens. *Infect Immun* 60:1894-1901.
- Bate CAW, Taverne J, Roman E, Moreno C, Playfair JHL, 1992c. Tumor necrosis factor induction by malaria exoantigens depends upon phospholipid. *Immunol* 75:129-35.
- Berendt AR, 1992. Sequestration and its discontent : infected erythrocyte-endothelial cell interactions in *Plasmodium falciparum* malaria. 54th Forum in Immunology, pp 21-8.
- Berendt AR, Ferguson DJP and Newbold CI, 1990. Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria : sticky cells and sticky problems. *Parasitol Today* 6(8):247-54.
- Berendt AR, McDowall A, Craig AG, Bates PA, Sternberg MJE, Marsh K, Newbold CI, Hogg N, 1992. The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell* 68:71-80.
- Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K, 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341:57-9.
- Beutler B and Cerami A, 1988. Tumor Necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Ann Rev Biochem* 57:505-18.
- Beutler B and Cerami A, 1990. Cachectin (Tumor Necrosis Factor) and Lymphotoxin as primary mediators of tissue catabolism, inflammation and shock. In : Cohen S, ed. *Lymphokines and the immune response*. Boca Raton, Florida. CRC Press, Inc., pp 199-212.

- Boudin C, Sheick I, Chumpitazi B, Pazart L, Hogh B, Peyron F, Deloron P, Picot S, Ambroise-Thomas P, 1994. The multifactorial and multistage character of protective immunity to *Plasmodium falciparum*, naturally acquired by an indigenous population in Burkina Faso. *Scan J Immunol* 39:409-17.
- Bradley DJ, 1995. The epidemiology of malaria in the tropics and in travelers. *Bailliere's Clinical Infectious Diseases* 2(2):211-26.
- Brown KN and Hills LA, 1974. Antigenic variation and immunity to *P. knowlesi* : antibodies which induce antigenic variation and antibody which destroys parasites. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 68(2):139-42.
- Brown AE, Webster HK, Teja-Isavadharm P, Keeratithakul D, 1990. Macrophage activation in falciparum malaria as measured by neopterin and interferon-gamma. *Clin exp Immunol* 82:97-101.
- Broxmeyer HE, 1995. Role of cytokines in hematopoiesis. In : Aggarwal BB, Puri RK, eds. *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Massachusset USA: Blackwell Science, Inc, p 459-76.
- Budiriyanto, Ketut Ardana, Gasem H, Hadisaputro S, Djokomuljanto, Lokollo D, Dharmana E, Karnadi E, Wartomo H, Sukoco G, 1992. Pola klinik penderita malaria berat dan test resistensi *P. falciparum* terhadap Klorokuin di Kab Jepara Jawa Tengah. Seminar resistensi obat pada malaria. TDRC FK Unair, Surabaya.
- Budyono M, Soewignjo S, Bambang S, Hartono B, 1991. Penyakit kardiovaskular dan cerebrovaskular di Ruang Penyakit Dalam RSUD Mataram *Jurnal RSUD Mataram* 3(4):155-66
- Bunn HF, 1991. Anetia. In: In : New York : *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, 12th Internat ed sect 9 pp344-48.
- Busse R, 1989. "Streaming blood" is main stimulus for nitric oxide release. *The News*, a Hoechst report of international opinion, nr. 30.
- Butcher GA, Garland T, Ajdukiewics AB, Clark IA, 1990. Serum tumor necrosis factor associated with malaria in patients in the Solomon Islands. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 84:658-61.
- Candradikusuma D, 1994. Contoh sebuah kasus KLB di Kabupaten Lombok Barat, Nusa Tenggara Barat. Seminar Malaria Tingkat Nasional Mataram, 26 Januari 1994.

- Caro HN, Shekh NA, Taverne J, Playfair JHL, Rademacher TW, 1996. Structural similarities among malaria toxins, insulin second messengers, and bacterial endotoxin *Infect Immun* 64(8):3438-41.
- Cheesbrough M, 1987. *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries vol I*. Burough Green, Kent, UK : Butterworth & Co, Ltd, pp221-51.
- Chizzolini C, Grau GE, Geinoz A, Schrijvers D, 1990. T lymphocyte interferon-gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin exp Immunol* 79:95-9.
- Chuncharunee S, Jootar S, Leelasiri A, Archararit N, Prayoonwiwat W, Mongkonritragoon W, Polvicha P, Srichaikul T, 1997. Level of serum Tumor Necrosis Factor alpha in relation to clinical involvement and treatment among Thai adults with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Med Assoc Thai* 80 Supl 1:S72-5.---- Abstract
- Clark IA, 1978. Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? *Lancet* ii:75-7.
- Clark IA, 1987a. Cell mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitol Today* 3(10):300-5.
- Clark IA, 1987b. Monokines and lymphokines in malaria pathology. *Ann Trop Med Parasitol* 81(5):577-85.
- Clark IA and Chaudry G, 1988a. The balance of useful and harmful effects of TNF, with special reference to malaria. *Ann Inst Pasteur Immunol* 139(3):305-6.
- Clark IA and Chaudry G, 1988b. TNF may contribute to the anemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 70(1):99-103.
- Clark IA and Chaudhri G, 1988c. TNF in malaria-induced abortion. *Am J Trop Med Hyg* 39(3):246-9.
- Clark IA, Chaudry G and Cowden WB, 1988. Interplay of reactive oxygen species and tumor necrosis factor in tissue injury. *Oxyradicals in molecular biology and pathology*. Alan R Liss, Inc., pp 53-60
- Clark IA, Chaudry G and Cowden WB, 1989. Roles of Tumor Necrosis Factor in the illness and pathology of malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 83:436-40.
- Clark IA and Cowden WB, 1999. Why is the pathology of *falciparum* worse than that of *vivax* malaria? *Parasitol Today* 15(11):459-61.

- Clark IA, Cowden WB and Butcher GA, 1990. TNF and inhibition of growth of *Plasmodium falciparum*. *Imlet* 25:175-8.
- Clark IA, Cowden WB and Chaudry G, 1990. The pleiotropic effects of Tumor Necrosis Factor in malaria. Bonavida B, Granger G (eds): *Tumor Necrosis Factor: Structure, mechanism of action role in disease and therapy*. Basel: Karger, pp:156-61.
- Clark IA, Hunt NH and Cowden WB, 1987. Immunopathology of malaria. Soulsby E.JL(ed): *Immune response in parasite infections. Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. Vol IV*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp 1-34.
- Clark IA, Ilshner S, MacMicking JD, Cowden WB, 1990. TNF and *Plasmodium berghei* ANKA-induced cerebral malaria. *Imlet* 25:195-8.
- Clark IA, Rockett KA and Cowden WB, 1991. Proposed link between cytokines, nitric oxide and human cerebral malaria. *Parasitol Today* 7(8):205-7.
- Clark IA, Rockett KA and Cowden WB, 1992. TNF in malaria. In : Beutler B (ed). *The molecules and their emerging role in medicine*. New York : Raven Press 303-21.
- Clark IA, Cowden WB and Rockett KA, 1995. Nitric oxide in cerebral malaria. *J Infect Dis* 171:1068
- Clark IA, Virelizier J, Carswell EA, Wood PR, 1981. Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infect Immun* 32(3):1058-66.
- Clemens MJ, 1991. *Cytokines*. Oxford, the UK: Bios Scient Publ.
- Conway DJ, 1997. Natural selection on Polymorphic malaria antigens and the search for a vaccine. *Parasitol Today* 13(1): 26-29.
- Curfs JHAJ, van der Meer JWM, Sauerwine RW, Eling WMC, 1992. Low dosage of Interleukin-1 protect mice against lethal cerebral malaria. Personal communication.
- Dachlan YP, Sri-Hidayati BS, Kusmartisnawati N, Bariah I, Anni SW. Penelitian malaria di dusun Labuhan Poh desa Sekotong Barat dan dusun Longlongan dan dusun Sayong desa Sekotong Tengah, Kecamatan Sekotong, Kabupaten Lombok Barat, Propinsi Nusa Tenggara Barat. *Aspek Parasitologi. Seminar Malaria Tingkat Nasional*. Mataram, 26 Januari 1994.
- Dajan Anto, 1986 (1994). Beberapa pengertian tentang korelasi dan ko-efisien korelasi. Dalam: *Pengantar metode statistik* hal 314-24. LP3ES, Jakarta.

- Deloron P, Campbell GH, Branding-Bennet D, Roberts J, Schwartz IK, Odera JS, Lal AA, Osanga CO, Cruz V, McCutchan TM, 1989. Antibodies to Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen and Plasmodium falciparum and Plasmodium malariae circumsporozoite protein : seasonal prevalence in Kenian villages. *Am J Trop Med Hyg* 41(4):395-9.
- Deloron P and Cot M, 1990. Antibodies to ring-infected erythrocyte surface antigen and circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum in a rural community of Burkina Fasso. *Trans Roy Soc Med Hyg* 84:191-5.
- Deloron P, Roux Lombard P, Ringwald P, Wallon M, Niyongabo T, Aubry P, Dayer JM, Peyron F, 1994. Plasma level of TNF- α soluble receptors correlate with outcome in human falciparum malaria. *Eur Cytok Netw* 5(3):331-6.
- Dinarello CA, 1990. Interleukin-1 and its biological related cytokines. In: Cohen S, eds. *Lymphokines and the immune response*. Boca Raton Florida: CRC Press Ch 8 pp146-179.
- Djarwanto A, 1996. Analisa korelasi linear sederhana. Dalam: *Mengenal beberapa uji statistik dalam penelitian*, hal 168-75. Liberti Yogyakarta.
- Djelantik IG, Budiono A, Oka IA, Felix HH, Hanato W, 1991. Malaria pada anak di RSUD Mataram. *Jurnal RSUD Mataram* 3(4):167-75.
- Doolan DL and Hoffman, 1997. Multi-gene vaccination against malaria : a multistage, multi-immune response approach. *Parasitol Today* 13(5):171-8.
- Druilhe P, Khusmith S, 1987. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of Plasmodium falciparum and malaria-immune status. *Infect Immun* 55(4):888-91.
- Druilhe PL, Renia L and Fidock DA, 1998. Immunity to liver stages. In: *Malaria. Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Sherman, IW, ed. Washington, DC.: ASM Press 34.513-543
- Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S, 1997. Taming TNF : strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 18(10):487-92.
- Eling WMC and Kremsner PG, 1994. Cytokines in malaria, pathology and protection *Biotherapy* 7:211-21.
- Eling WMC and Sauerwein RW, 1995. Severe and cerebral malaria: common or distinct pathophysiology? *Rev Med Microbiol* 6(1):17-25.
- Emiliana Tjitra, 1989b. Hubungan beratnya penyakit malaria falciparum dengan kepadatan parasit pada penderita dewasa. *CDK* 55:19-23.

- Emiliana T, Sekartuti, Renny M, Arbani PR, Hariani AM, 1993. Sensitivitas *Plasmodium falciparum* terhadap beberapa obat anti malaria di desa Pekandangan, Jawa Tengah. *Cermin Dunia Kedokteran* 82:53-56.
- Esslinger CW, Picot S, Ambroise-Thomas P, 1994. Intra-erythrocytic *Plasmodium falciparum* induces up-regulation of inter-cellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells in vitro. *Scand J Immunol* 39:229-32.
- Farrar M, Schreiber R, 1993. Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages). *Annu Rev Immunol* 11:57-611.
- Faust EC, Russell PF and Jung RC, 1970. *Craig and Faust's Clinical Parasitology* 8ed Philadelphia: Lea and Febiger.
- Ferrante A, Kumaratilake L, Rzepczyk CM, Dayer JM, 1990. Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages). *Immunol Letters* 25:179-88.
- Francis N and Warrell DA, 1993. In: Gilles and Warrell D, eds. Pathology and pathophysiology of human malaria. In : Gilles HM and Warrell DA, eds. *Bruce-Chwatt's essential malariology* 3rd ed. London: Arnold, Hodder Headline Group 4.50-9.
- Fribourg-Blanc A, Druilhe P, Brasseur P, Rhodes-Feuillette A, Ballet JJ, Tharavanu S, 1985. Immunological evaluation of cell-mediated and humoral immunity in Thai patients with cerebral and non cerebral *Plasmodium falciparum* malaria : II. Evolution of serum levels of immunoglobulins, antimalarial antibodies, complement fractions and alpha Interferon. *SEA J Trop Med Publ Hlth* 16(2):307-13.
- Frick A, 1997. The era of infectious diseases is not over. Seminar Parasitologi Nasional. Surabaya, Desember 1997.
- Fryauff DJ, Baird JK, Candradikusuma, Masbar S, Sutamihardja MA, Leksana B, Tuti S, Marwoto H, Richie T, Romzan A, 1997. Survey of in vivo sensitivity to chloroquine by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in Lombok, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*, 56(2):241-4.
- Fryauff DJ, Soekartono, Tuti S, Leksana B, Suradi, Sudent Tandayu, Baird JK, 1998a. Survey of resistance in vivo to Chloroquine of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in North Sulawesi, Indonesia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 92:82-3.
- Fryauff DJ, Tuti S, Mardi A, Masbar S, Patipelohi R, Leksana B, Kain KC, Bangs MJ, Richie TL, Baird JK, 1998b. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in

- transmigration settlements of West Kalimantan, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 59(4): 513-8.
- Ghigo D, Todde R, Ginsburg H, Costamagna C, Gautret P, Bussolino F, Ullier D, Giribaldi G, Deharo E, Gabrielli G, et al, 1995. Erythrocyte stage of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release an NOS-inducing soluble factor. *J Exp Med* 182 :677-88.
- Graninger W, Prada J, Neifer S, Zotter G, Thalhammer F, Kremsner PG, 1994. Up-regulation of ICAM-1 by *Plasmodium falciparum* : in vitro and in vivo studies. *J Clin Pathol* 47(7):653-6.
- Grau GE, 1992. TNF in cerebral and non-cerebral malaria. *Eur Cytokine Netw* 3(2):128.
- Grau GE and Behr C, 1995. Cytokines and malaria: for better or worse. In : Aggarwal BB, Puri RK, eds. *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Massachusetts, USA : Blackwell Science, Inc, CH 30 p 459-76.
- Grau GE, Bieler G, Pointaire P, De Kossodo S, Tacchini-Cotier F, Vassali P, Piquet PF, Lambert PH, 1990. Significance of cytokine production and adhesion molecules in malarial immunopathology. *ImLet* 25:189-94.
- Grau GE, Fajardo LF, Piquet PF, Alet B, Lambert PH and Vassali P, 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) is an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237:1210-2.
- Grau GE, Heremans H, Piquet P, Pointaire PF, Lambert PH, Billiau A, Vassali P, 1989a. Monoclonal antibody against interferon γ can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5572-74.
- Grau GE, Kindler V, Piquet PF, Lambert PH and Vassali P, 1988. Prevention of experimental Cerebral Malaria by anticytokine antibody IL-3 and GM-CSF are intermediates in increased TNF production and macrophage accumulation. *J Exp Med* 168:1499-1504
- Grau GE, Piquet PF, Vassalli P, Lambert PH, 1989b. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria : experimental and clinical data. *Immunol Rev* 112:49-70.
- Grau GE, Piquet PF, Vassalli P, Lambert PH, 1989c. Involvement of Tumor Necrosis Factor and other cytokines in immune-mediated vascular pathology. *Int Arch All Appl Immunol* 88:34-9.

- Grau GE, Taylor TE, Molineau M E, Wirima JJ, Vassali P, Hommel M, Lambert PH, 1989d. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *New Engl J Med* 320(24):1586-9.
- Greenwood BM, Marsh K and Snow R, 1991. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today* 7:277-81.
- Gunawan S dan Soewignjo S, 1991. Kasus "malarial hepatitis" di Ruang Hepatologi RSU Mataram. *Jurnal RSU Mataram* 3(4):144-54
- Harijani AM and Martono, 1991. Malaria di Kabupaten Sikka, Flores. *Cermin Dunia Kedokteran* 70:35-41.
- Harpaz R, Edelman R, Wasserman SS, Levine MM, Davis JR, Szein MB, 1992. Serum cytokine profiles in experimental human malaria. *J Clin Invest* 90: 515-23.
- Hermesen CC, Crommert JVD, Fredrix H, Sauerwein RW, Eling WMC, 1997. Circulating Tumor Necrosis Factor α is not involved in the development of cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected C57Bl mice. *Parasite Immunol* 19(12):571-7.
- Hermesen C, Van De Wiel T, Mommers E, Sauerwein RW, Eling WMC, 1997. Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria in end-stage disease. *Parasitol* 114:7-12.
- Higuchi M, Higashi N, Nishimura Y, Toyoshima S, Osawa T, 1991. TNF-mediated cytotoxicity. Importance of intracellular cGMP level for determining TNF-sensitivity. *Molec Immunol* 28(9):1039-44
- Ho M and Sexton MM, 1995. Clinical immunology of malaria. In: *Malaria. Bailliere's Clinical Infectious Diseases. International Practice and Research* 2 (2):227-47.
- Ho M, Schollaardt T, Snape S, Looareesuwan S, Suntharasamai P, White NJ, 1998. Endogenous Interleukin-10 modulate proinflammatory response in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 178(2):520-5.
- Hogh B, Nuahn T, Marbiah, Petersen E, Perlmann H, Dolopaye E, Hanson AP, Bjorkman A, Perlmann P, 1991. A longitudinal study of seroreactivities to *Plasmodium falciparum* antigens in infants and children living in a holoendemic area of Liberia. *Am J Trop Med Hyg* 44(2):191-200.
- Hommel M, 1993. Amplification of cytoadherence in cerebral malaria : towards a more rational explanation of disease pathophysiology. *Ann Trop Med Parasitol* 87(6): 627-35.

- Howard RJ, 1988. *Plasmodium falciparum* proteins at the host erythrocyte membrane : their biological and immunological significance and novel parasite organelles which deliver them to the cell surface. In : Englund PT, SherA, eds. *Biology of parasitism*. New York: Allan R Liss Inc. p 111-45.
- Howard RJ, Handunnetti SM, Hasler T, Gilladoga A, Aguiar JC, Pasloske BL, Morehead K, Albrecht GR, Schravendijk MR, 1990. Surface molecules on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes involved in adherence. *Am J Trop Med Hyg* 43(2) Suppl:15-29.
- Hulley SB and Cummings SR, 1988. *Designing Clinical Research* Baltimor: William & Wilkins.
- Ingram RH, 1994. Adult respiratory distress syndrome. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13.ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 230.1240-3.
- Isselbacher KJ, 1994. Bilirubin metabolism and hyperbilirubinemia. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13.ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 265.1453-8.
- Jacobs P, Radzioch D and Stevenson MM, 1995. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J Immunol* 155:5306-13.
- Jacobs P, Radzioch D and Stevenson MM, 1996a. In vivo regulation of nitric oxide production by Tumor Necrosis Factor alpha and gamma Interferon, but not by Interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Inf Immun* 64(1):44-9.
- Jacobs P, Radzioch D and Stevenson MM, 1996b. A Th1-associated increase in Tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 64(2):535-41.
- Jakobsen PH, Moon R, Ridley RG, Bate CAW, Taverne J, Hansen Mb, Takacs B, Playfair JHL, McBride JS, 1993a. Tumor Necrosis Factor and interleukin-6 production induced by components associated with merozoite proteins of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol* 15:229-37.
- Jakobsen PH, Morris-Jones S, Ronn A, Hviid L, Theander TG, Elhassan IM, Bygbjerg IC, Greenwood BM, 1994. Increased plasma concentration of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* malaria and association with disease severity. *Immunol* 83:665-9.
- Jakobsen PH, Bate CAW, Taverne J, Playfair JHL, 1995. Malaria : toxins, cytokines and disease. *Parasite Immunol* 17:223-31.

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, 1999. Immunobiology. The immune system in health and disease. 4 ed. London : Elsevier Science Ltd.
- Jensen JB, Hoffman SL, Boland MT, Akkod MAS, Laughlin LW, Kurniawan L, Marwoto HA, 1984. Comparison of immunity to malaria in Sudan and Indonesia : crisis form versus merozoite-invasion inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:922-5.
- Jeong JY and Jue DM, 1997. Chloroquine inhibit processing of Tumor Necrosis Factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 158(10):4901-7.
- Kapas I, Shibata M and Krueger M, 1995. Role of cytokines in sleep, fever, and anorexia. In : Aggarwal BB, Puri RK, eds. Human cytokines: their role in disease and therapy Massachusetts, USA : Blackwell Science, Inc, , CH 19 p 306-14.
- Kaplan D, 1996. Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines *Immunol Today* 17(7):303-4.
- Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Kwiatkowski D, Del Giudice G, Mendis KN, 1992a. Tumor necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune Plasmodium vivax malaria patients. *Clin exp Immunol* 88:499-505.
- Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R, Mendis KN, 1992b. Dynamics of fever and serum levels of Tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in Plasmodium vivax malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3200-3203.
- Kerlinger, FN, 1964. Foundations of behavioral research. 2.ed. New York : Holth, Rinehart and Winston pp25-50.
- Kern P, Hemmer CJ, Gallati H, Neifer S, Kremsner P, Dietrich M, Porszolt F, 1992. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria *JID* 166:930-4.
- Kern P, Hemmer CJ, van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M, 1989. Elevated tumor necrosis factor α and IL-6 serum levels as markers for complicated *P. falciparum* malaria. *Am J Med* 87(2):139-43.
- Kossodo SC and Grau GE, 1997. Cytokines and malaria. In: Remick DG and Friedland JS (eds) : Cytokines in health and disease, 2nd ed, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE, 1997. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunol* 91(4):536-40.

- Kremsner PG, Feldmeier H, Zotter GM, Jansen-rosseck R, Graninger W, Rocha RM, Bienzle U, 1989. Immunological alterations in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Relationship between parasitemia and indicators of macrophage activation. *Acta Trop* 46:351-9.
- Kremsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Rocha RM, Jansen-rosseck R, Bienzle U, 1990. Immune response in patients during and after *Plasmodium falciparum* infection. *J Inf Dis* 161:1025-8.
- Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Wildling E, Jenne GE, 1995. Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by elevated capacity of TNF production. *Am J Trop Med Hyg* 53(5):532-8.
- Kubata BK, Eguchi N, Urade Y, Yamashita K, Mitamura T, Tai K, Hayaishi O, Hori T, 1998. *Plasmodium falciparum* produces Prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic and immunosuppressive substances in human. *J Exp Med* 188(6):1197-202.
- Kuby J, 1992. *Immunology*. Freeman and Company, New York.
- Kumaratilake LM, Ferrante A, Jaeger T, Rzepczyk M, 1992. Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *P. falciparum* merozoites. *Inf Immun* 60(9):3731-8.
- Kuntarijanto, 1999. Program pemberantasan malaria dan permasalahannya di Propinsi Jawa Timur tahun 1994-1998. Seminar malaria : kewaspadaan terhadap munculnya kembali penyakit malaria di daerah non endemis terutama di Jawa Timur. Surabaya (TDC), 10 April 1999.
- Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BG, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Behr C, Hviid L, 1998. Low plasma concentration of Interleukin-10 in severe malarial anemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351(9118):1768-72.
- Kwiatkowski D, 1989. Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Exp Med* 169:357-61.
- Kwiatkowski D, 1995. The biology of malaria fever. *Bailliere's Clinical Infectious Diseases* 2 (2):371-88.
- Kwiatkowski D and Bate C, 1995. Inhibition of Tumor Necrosis Factor (TNF) production by antimalarial drugs used in cerebral malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 89:215-6.

- Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM, 1989. Tumor necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol* 77:361-6.
- Kwiatkowski D, Bate CAW, Scragg JG, Beattie P, Udalova I, Knight JC, 1997. The malarial fever response – pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention. *Ann Trop Med Paras* 91(5):533-42.
- Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM, 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet* 336:1201-4.
- Lancaster JR, 1992. Nitric oxide in cells. *Amer Scientist* 80 248-59
- Lang CH, 1995. Role of cytokines in glucose metabolism. In : Aggarwal BB, Puri RK, eds. *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Blackwell Science, Inc. Mass, USA, CH 16:272-84
- Loareesuwan S, 1997. Drug resistance among malaria patients in Thailand. Seminar Parasitologi Nasional, Surabaya 21 Nopember 1997
- Lou J, Donati JR, Juillard P, Giroud C, Vesin C, Mili N, Grau GE, 1997. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 151(5):1397-405
- Lucas R, Juillard P, Decoster E, Redard M, Burger D, Donati Y, Giroud C, Monso Hinard C, De Kesel T, Buurman WA, Moore MW, Dayer JM, Fiers W, Bluethmann H, Grau GE, 1997a. Crucial role of Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental Cerebral Malaria. *Eur J Immunol* 27(7):1719-25.
- Lucas R, Lou JN, Juillard P, Moore M, Bluethmann, Grau GE, 1997b. Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol* 72(2):143-8.
- Lucas R, Lou JN, Morel DR, Ricou B, Suter PM, Grau GE, 1997c. TNF receptors in the microvascular pathology of acute respiratory distress syndrome and Cerebral Malaria. *J Leuk Biol* 61(5):551-8
- Lunel F, Druilhe P, 1989. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun* 57(7).2043-9.

- Male D, Champion B, Cooke A, 1987. *Advanced Immunology*, ch11. Philadelphia : Lippincot Company.
- Maubert B, Guilbert LJ and Deloron P, 1997. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule-1 and chondroitin-4-sulphate expressed by syncytiotrophoblast in the human placenta. *Infect Immun* 65(4):1251-7.
- McGregor IA et al, 1956. Effects of heavy and repeated malarial infections on Gambian children. Effects of erythrocytic parasitization. *Br Med J*:686-92.
- McGuire W, Hill AVS, Alisopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D, 1994. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371:508-11.
- McGuire W, Hill AVS, Greenwood BM, Kwiatkowski D, 1996. Circulating ICAM-1 levels in *falciparum* malaria are high but unrelated to disease severity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90:274-6.
- Medana JM, Hunt NH, Chaudri G, 1997. Tumor Necrosis Factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 150(4):1473-86.
- Melancon-Kaplan J, Burns JM, Vaidya AB, Webster HK, Weidanz WP, 1993. *Malaria*. In : Warren KS, ed. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*, 3 ed. Blackwell Scientific Publ, Oxford etc, Ch 14 p302-51.
- Miller KL, Silverman PH, Kullgren B, Mahlmann LJ, 1989. Tumor Necrosis Factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* 57(5):1542-46.
- Milhous WK and Kyle DE, 1998. Introduction to the modes of action of and mechanism of resistance to anti malarials. In : *Malaria. Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Ed: Irwin W Sherman. ASM Press, Washington 21.303-16.
- Mohan K and Stevenson MM, 1998. Acquired immunity to asexual blood stages. In : Irwin W Sherman (ed). *Malaria. Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington: ASM Press, Ch 32 pp 467-93.
- Molineux ME, 1995a. *Malaria. Current Diagnosis and Treatment*, British Edition, Current Medicine Inc, London.
- Molineux ME, 1995b. The clinical manifestations and diagnosis of malaria. *Bailliere's Clinical Infectious Diseases* 2(2):271-92.

- Molineux ME, Taylor TE, Wirima JJ, Borgstein A, 1989. Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria : a study of 131 comatose Malawian children. *Quart J Med, New Series* 71(265):441-59.
- Moncada S, Palmer RMJ and Higgs EA, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-42.
- Munro BH, Visintainer MA and Page EB, 1986. *Statistical methods for health care research*. Philadelphia . JB Lippincot Co.
- Murray MJ, Murray NJ, Murray AB, Murray MB, 1975. Refeeding-malaria and hyperferraemia. *The Lancet* 653-4.
- Nabarro D, 1999. Roll back malaria. South East Asia consensus building and inception. Delhi, May 4th, 1999.
- Najera JA, Kouznetzsov, Delacollette C, 1998. Malaria epidemics. Detection and control, forecasting and prevention. WHO/Mal/98.1084.
- Nathan CF and Gabay J, 1992. Antimicrobial mechanisms of macrophages. In: Van Furth R (ed): *Mononuclear Phagocytes*. Netherlands: Kluwer Acad Publ 34.259-67.
- Nauck EG, 1967. *Lehrbuch der Tropenkrankheiten 3 Aufl*. Stuttgart: George Thieme Verlag.
- Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Alister C, Snow B, Msobo M, Norbert P, Marsh K, 1997. Receptor-specific adhesion and clinical disease in plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg* 57(4):389-98
- Ockenhouse CF, 1994. Cell adhesion molecules in host-parasite interactions. In : Wegner CD (ed) : *Adhesion molecules*. Academic Press, London : Ch13 p277-91.
- Ockenhouse CF, Betageri R, Springer TA, Staunton DE, 1992a. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell* 68:63-9.
- Ockenhouse CF, Ho M, Tandou NN, van Seventer GA, Shaw S, White NJ, Jamieson GA, Chulay JD, Webster HK, 1991. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria : differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *JID* 164:163-9.
- Ockenhouse CF, Tandon NN, Jamieson GA, Greenwalt DE, 1993. Antigenic and functional differences in adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human and bovine CD36. *Inf Immun* 61(5):2229-32.

- Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR, 1992b. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes : roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 176:1183-89
- Oh SS, Chishti AH, Palek J, Liu S, 1997. Erythrocyte membrane alterations in *Plasmodium falciparum* malaria sequestration. *Curr Opin Hematol* 4:148-54.
- Omer FM, Riley FM, 1998. Transforming growth factor beta is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med* 188(1):39-48.
- Pasvol G, Clough B, Carlsson J, Snounou G, 1995. The pathogenesis of severe *falciparum* malaria. *Bailliere's Clin Inf Dis* 2 (2).249-70.
- Petersen E, Hogg B, Marbiah NT, Perlmann H, Willcox M, Dolopaie E, Hanson AP, Bjorkman A, Perlmann P, 1990. A longitudinal study of antibodies to the *P. falciparum* antigen Pf155/RESA and immunity to malaria infection in adult Liberians. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 84 339-45.
- Phillips SM, 1993. Mechanism of immunopathology in parasitic infections. In :Warren KS, ed. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*, 3 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publ, Ch 4 p52-86.
- Pichyangkul S, Saengkrai P, Webster K, 1994. *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β . *Am J Trop Med Hyg* 51(4):430-5.
- Pichyangkul S, Saengkrai P, Yongvanitchit K, Heppner DG, Kyle DE, Webster HK, 1997. Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 57(4).383-388
- Picot S, Peyron F, Deloron P, Boudin C, Chumpitazi B, Barbe G, Vuillez JP, Donadille A, Ambroise-Thomas P, 1993. Ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) induces tumor necrosis factor-alpha production. *Clin Exp Immunol* 93:184-8.
- Picot S, Peyron F, Vuillez JP, Barbe G, Marsh K, Ambroise-Thomas P, 1990. Tumor Necrosis Factor production by human macrophages stimulated in vitro by *Plasmodium falciparum*. *Inf Immun* 58(1):214-6.
- Picot S, Peyron F, Vuillez JP, Polack B, Ambroise-Thomas P, 1991. Chloroquine inhibits Tumor Necrosis Factor production by human macrophages in vitro. *J Inf Dis* 164:830.

- Playfair JHL, Taverne J and Bate CAW, 1991a. Don't kill the parasite: control the disease. *Acta Leidens* 60(1):157-65.
- Playfair JHL, Taverne J and Bate CAW, 1991b. Vaccination against malaria : the anti-disease concept. Article – personal communication from Dr. J. Taverne.
- Playfair JHL, Taverne J, Bate CAW, de Souza, 1990. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol Today* 11(1):25-7.
- Polder TW, Eling WMC, Trinh KA, Phan T, Jerusalem CR, 1989. Histopathology of cerebral malaria (*Plasmodium falciparum*) of treated and untreated patients, pregnant women and drug addicts. In: *Morphology of cerebral malaria, clinical and experimental study*. Dissertation. University of Amsterdam, Netherlands, pp 135-60.
- Prada J, Graninger W, Lehman Lg, Metzger W, Neifer S, Zotter GM, Thalhammer F, Bienzle U, Kremsner PgG, 1995. Upregulation of ICAM-1, IL-1 and oxygen intermediates (ROI) by exogenous antigens from *Plasmodium falciparum* parasites in vitro, and of sICAM-1 in the acute phase of malaria. *J Chemother* 7:424-6.
- Rafei UM, 1997. Malaria in the South East Asian Region. WHO Regional Office for SEA, New Delhi.
- Ray K, Bhattacharya D, Mukherjee AK, Upreti HB, Chowdhuri ANR, 1992. Evaluation of Indirect Immunofluorescent antibody test for detection of IgM specific antibodies in malaria. *J Communic Dis* 24(2):82-6.
- Rhee, M and Riley E, 1998. Comparing immune responses to malaria naïve and malaria-exposed individuals by measuring the production of IFN- γ and IL-12 to *Plasmodium falciparum* antigen in vitro. P19-p48. 10th Malaria Meeting of British Society for Parasitology. Edinburgh, 21-23 September 1998.
- Richards AL, 1997. Tumour necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. *International Journal for Parasitology* 27(10): 1251-63.
- Riley EM, Anderson G, Otoo J.N, Jepsen S, Greenwood BM, 1988. Cellular immune response to *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children during and after an acute attack of falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* 73(1):17-22.
- Riley EM, 1999. Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infection? *Immunol Today* 20(5):228-33.
- Ringwald P, Peyron F, Lepers JP, Rabarison P, Rakotomalala C, Razanamparany M, Rabodonirina M, Roux J, Le Bras J, 1993. Parasite virulence factors during

- falciparum* malaria: rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines. *Infect Immun* 61(12):5198-204.
- Rockett KA, Auburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA, 1992. In Vivo induction of nitrite and nitrate by Tumor Necrosis Factor, Lymphotoxin, and Interleukin-1: Possible role in malaria. *Infect Immun* 60(9):3725-50
- Rockett KA, Auburn MM, Cowden WB, Clark IA, 1991. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Inf Immun* 59(9):3280-3.
- Rockett KA, Clark IA, Cowden WB, 1992. Does nitric oxide play a role in control of the erythrocytic stage of malaria parasites by the immune system? Abstracts of XII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Pattaya, Thailand, Nov 29-Dec 4, 1992 p 84.
- Rockett KA, Kwiatkowski D, Bate CAW, Auburn MM, Rockett EJ, Clark IA, 1996. In vitro induction of nitric oxide by an extract of *Plasmodium falciparum*. *J Inf Dis* 32(3):187-96.
- Roitt I, Brostoff J, Male D, 1996. *Immunology*, 4th ed. St Louis: Mosby..
- Roitt I, 1994. *Essential Immunology* 8 ed. London : Blackwell Scientific Publ.
- Rosenthal PJ and Meshnick SR, 1998. Hemoglobin processing and the metabolism of amino acids, heme and iron. In : Irwin W Sherman (ed): *Malaria. Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington : ASM Press. Ch10 pp145-158.
- Roy S, McGuire W, Masci-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D. 1997. Tumor Necrosis Factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infec Dis* 176(2):530-2.
- Rudin W, Eugster HP, Bordmann G, Bonato J, Muller M, Yamage M, Ryffel B, 1997a. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol* 150(1):257-66.
- Rudin W, Favre N, Bordmann G, Ryffel B, 1997b. Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27(4):810-5.
- Rui-Mei L, Kara AU, Sinniah R, 1998. Dysregulation of cytokine expression in tubulointerstitial nephritis associated with murine malaria. *Kidney Int* 53(4):845-52.
- Rzecznyk CM, Anderson K, Stamatiou S, Townsend E, Allwort A, McCormack J, Whitby M, 1997. Gamma delta T cells: their immunobiology and role in malaria infections. *Int J Parasitol* 27(2):191-200.

- Schlichterle IM, Treutiger CJ, Fernandes V, Carlson J, Wahlgren M, 1996. Molecular aspects of severe malaria. *Parasitol Today* 12(9):329-32.
- Schofield L and Hackett F, 1993. Signal transduction in host cells by a Glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 177: 145-53
- Schofield L, Vivas L, Hackett F, Gerold P, Schwarz RT, Tachado S, 1993. Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF- α -inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 87(6):617-26.
- Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, Davachi F, Lyamba B, Hightower AW, Breman JG, Nguyen-Dinh P, 1991. Tumor Necrosis Factor and severe malaria. *J Infect Dis* 163:96-101
- Sher A, 1988. Vaccination against parasites : special problems imposed by the adaption of parasitic organism to the host immune response. In: Englund PT, Sher A, eds. *The Biology of Parasitism : a molecular and immunological approach*. Alan R Liss, Inc, New York, USA, p169-82.
- Siegel S, 1986(1992). *Statistik non-parametrik untuk ilmu-ilmu sosial*. Jakarta : Penerbit PT Gramedia.
- Soedarto, Martono, Subagyo Yotopranoto, Zaenal Arifin, 1994. Studies on Anopheline fauna and specific breeding habitats in Lombok Barat, Nusa Tenggara Barat Province, Indonesia, 1992-1993. Seminar Malaria Tingkat Nasional. Mataram, 26 Januari 1994.
- Soewignjo S, Wenny AA, Budyono M, 1992. The clinical picture of adult malaria cases in Mataram General Hospital. Seminar resistensi obat pada malaria. TDRC FK Unair, Surabaya.
- Sri-Hidajati BS, Dachlan YP, Kusmartisnawati, Sri Subekti, Bariah Ideham, Ani Syafriah, Machfudz, 1994. Penelitian malaria di dusun Labuhan Poh desa Sekotong Barat dan dusun Longlongan dan dusun Sayong desa Sekotong Tengah, Kecamatan Sekotong, Kabupaten Lombok Barat, Propinsi Nusa Tenggara Barat. Aspek Parasitologi. Seminar Malaria Tingkat Nasional. Mataram, 26 Januari 1994.
- Sri-Hidajati BS, Dachlan YP, Kusmartisnawati, Subekti S, Ideham B, Syafriah A, Kuntoro, 1997. Seroepidemiology study on malaria using circumsporozoite and ring-infected erythrocyte surface antigen in Lombok, West Nusa Tenggara, Indonesia. *Acta Med Indon* 29(3):175-85.
- Sri-Hidajati BS, Kusmartisnawati, Dachlan YP, Siswanto D, 1992. Seroepidemiology study on malaria using ELISA with crude antigen in three villages in Lombok Barat

- Regency, West Nusa Tenggara. Regional Meeting of Indonesian Society for Parasite Control. Parasitologi FK Unair, Surabaya.
- Sri-Hidajati BS, Tantular IS, Pusarawati S, Dachlan YP, 1994. *In vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum*. Seminar on Cell and Tissue culture in medicine. TDRC, Airlangga Univ. Surabaya, July 1994.
- Sungkar S dan Pribadi W, 1992. Resistensi *P. falciparum* terhadap obat-obat malaria. *Maj Kedok Indon* 42(3):155-62.
- Sutherland CJ, 1998. The flip-side of cytoadherence: immune selection , antigenic variation and the var genes of *P. falciparum*. *Parasitol Today* 14(8):329-32
- Taverne J, Bate CAW, Kwiatkowski D, Jakobsen PH, Playfair JHL, 1990a. Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce Tumor Necrosis Factor Release from macrophages. *Inf Immun* 58(9):2923-8.
- Taverne J, Bate CAW, Playfair JHL, 1990b. Malaria exoantigens induce TNF, are toxic, and are blocked by T-independent antibody. *Immunol Lett* 25:207-12.
- Taverne J, Bate CAW, Sarkar DA, Meager A, Rook GAW, Playfair JHL, 1990c. Human and murine macrophages produce TNF in response to soluble antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol* 12:33-43.
- Taylor K, Bate CAW, Carr RE, Butcher GA, Taverne J, Playfair JHL, 1992. Phospholipid containing toxic malaria antigens induce hypoglycaemia. *Clin Exp Immunol* 90:1-5.
- Taylor-Robinson AW, 1995. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* 11(9):334-42.
- Tharavanij S, Warrell MJ, Tantivanich S, Tapchaisri P, Chongsa-Nguan M, Prasertsiriroj V, Patarapotikul J, 1984. Factors contributing to the development of cerebral malaria. II. Humoral immune responses. *Am J Trop Med Hyg* 33(1):1-11. – WHO Quart – skrip kumpulan abstr tulis tangan.
- Trager W and Jensen JB, 1977. Cultivation of erythrocytic stages. *Bul WHO* 55(2-3):363-365.
- Trigg PI and Kondrachine AV, 1998. The current global malaria situation. In : *Malaria. Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Ed: Irwin W Sherman, ASM Press, Washington Ch2 pp11-24.
- Turner GD, Ly VC, Nguyen TH, Tran TH, Nguyen HP, Bethell D, Wyllie S, Louwrier K, Fox SB, Gatter KC, Day NP, White NJ, Berendt AR, 1998. Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular

- endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. *Am J Pathol* 152(6):1477-87.
- Udeinya JJ, 1990. In vitro and ex vivo models of sequestration in *Plasmodium falciparum* infection. *Am J Trop Med Hyg* 43(2)suppl:2-5.
- Udomsangpetch R, Webster HK, Pattanapanyasat K, Pitchyangkul S, Thaithong S, 1992. Cytoadherence characteristics of rosette-forming *Plasmodium falciparum*. *Inf Immun* 60(11):4483-90.
- Udongangpetch R, Chivapat S, Viriyavejakul P, Riganti M, Wilairatana P, Pongponratin E, Looareesuwan S, 1997. Involvement of cytokines in the histopathology of cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 57(4):501-4
- Van der Meer JWM, Endres S, Lonnemann G, Cannon JG, Ikejima T, Okusawa S, Gelfand JA, Dinarello CA, 1988. Concentrations of immunoreactive human tumor necrosis factor alpha produced by mononuclear cells in vitro. *J Leuk Biol* 43:216-23.
- Van Leenen D, Van der Poll T, Van Deventer SJH, 1992. Tumor necrosis factor. Induction and biological effects in humans. Van Furth, R : *Mononuclear Phagocytes*. Netherlands : Kluwer Acad Publ : 46.346-54.
- Wahlgren M, Abram JS, Fernandes V, Bejarano MT, Azuma M, Torii M, Aikawa M, Howard RJ, 1995. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells and secretion of cytokines (IL-1 beta, IL-1 RA, IL-6, IL-8, IL-10, TGF beta, TNF alpha, G-CSF, GM-CSF). *Scand J Immunol* 42:626-36.
- Wahlgren M, Barragan A, Chen Q, Fernandes V, Hagblom P, Hedding A, Schlichterle M, Scholander C, Sundstrom A, Treutiger CJ, von Euler A, Carlson J, 1998. Rosetting of Malaria-infected erythrocytes : ligands, host receptors, and the involvement of serum proteins In . *Malaria. Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Ed: Irwin W Sherman ASM Press, Washington 27.387-98.
- Wahlgren M, Carlson J, Udomsangpetch R, Perlmann P, 1989. Why do *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes? *Parasitol Today* 5(6):183-5
- Wahlgren M, Fernandez V, Scholander C, Carlson J, 1994. Rosetting. *Parasitol Today* 10(2):73-8
- Warrell DA, Molinoux ME, Beales PF, 1990. Severe and complicated malaria. WHO Division of control of tropical diseases. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 84 suppl 2

- Weiss G, Wachter H and Fuchs D, 1995. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol Today* 16(10):495-500.
- White NJ, 1998. Malaria pathophysiology. In : *Malaria Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Ed Irwin W Sherman. ASM Press, Washington Ch26.
- White NJ and Pfordde JJ, 1991. Malaria. In : *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 12th Internat ed 783-91 McGraw-Hill, New York etc.
- WHO, 1987. WHO Technical Report Series 743. The biology of malaria parasites.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW, 1997. Effects of a polymorphism in the human Tumor Necrosis Factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(7):3195-9.
- Wozencraft AO, Dockrell HM, Taverne J, Targett GAT, Playfair JHL, 1984. Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products. *Inf Immun* 43(2):664-9.
- Yoshimoto T, Takahama, Y, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Nariuchi H, 1998. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immunol* 160(11):5500-5.
- Zainuddin M, 1988. *Metodologi Penelitian*. Buku ajar Program Pascasarjana Unair, Surabaya.

Lampiran 1

DATA KLINIK PENDERITA RSU MATARAM

No	No pen-derita/sampel	PAR spp	TNF pg/ml	D.hambat		Kejuhnan		Panas t	Tensi		Hipo glikemia	Hb g%	Le ko sit	Tror bo sit	Fungsi hati				Fungsi ginjal									
				G5	L5	de-mam	nyeri		kep/n/v	sist					dias	ikt	SGOT	SGPT	BNI	war na	Ure	Kre	Leu	Bili	Uro	Leu	Err	
1	1/2/1	4F	3.87			1	1	1	39.0	120	80	175	16.0	6.5	211	0	43	42	1.71	n	49	1.4	0	0	0	0	0	0
2	1/2/2	1F	2041.01						36.0	110	70	145	15.5	6.8	205	0	24	30	0.97	n	36	1.2	0	0	0	0	0	0
3	2/2/1	3F+G	43.93			1	1	1	39.0	110	70	125	11.6	10.9	205	1	19	31	1.71	n	49	1.4	0	0	0	0	0	0
4	2/2/2	0	205.66			1	1	1	36.0	110	70	140	12.0	8.8	216	0	16	23	0.94	n	27	1.1	0	0	0	0	0	0
5	3/2/1	4F+G				1	1	0	38.4	120	80	136	12.9	5.5	191	1	37	30	2.70	n	42	1.2	0	0	0	0	0	0
6	3/2/2	0	83.99			1	1	0	36.0	100	70	118	10.3	9.4	311	1	31	44	0.26	n	30	1	0	0	0	0	0	0
7	4/1/1	4F	214.56			1	1	1	37.2	120	80	124	14.8	6.8	276	1	49	53	0.90	n	23	0.8	0	0	0	0	0	0
8	5/1/1	4F	115.15			1	1	1	38.0	100	70	100	12.6	6.1	254	0	15	24	0.79	n	20	0.6	0	0	0	0	0	0
9	6/2/1	3F	76.57			1	1	1	40.0	100	70	87	12.6	9.6	252	0	43	51	0.60	n	32	0.8	0	0	0	0	0	0
10	6/2/2	1F	73.61			1	1	1	36.4	110	70	90	13.1	6.7	180	0	24	36	0.70	n	40	1.1	0	0	0	0	0	0
11	7/2/1	1V	0.00			1	1	1	39.0	110	70	99	13.7	5.9	213	0	17	20	0.50	n	24	0.7	0	0	0	0	0	0
12	7/2/2	0	0.00						37.0	120	70	100	12.4	6.1	205	0	14	11	0.80	n	23	0.5	0	0	0	0	0	0
13	8/1/1	1F+G	24.64						37.0	100	60	94	10.8	5.7	261	0	10	16	0.70	n	32	0.7	0	0	0	0	0	0
14	9/2/1	4F+G	61.74			1	1	1	38.0	110	70	123	7.4	6.5	226	0	14	12	0.65	n	29	0.9	0	0	0	0	0	0
15	9/2/2	1F+G	30.58			1	0	0	36.0	110	60	100	8.4	7.0	231		11	6	0.90	n	32	0.7	0	0	0	0	0	0
16	10/1/1	1V	0.00			1	1	1	36.4	110	70	123	5.1	16.4	211	0	16	15	0.29	n	33	1.1	0	0	0	0	0	0
17	11/1/1	1F	0.00			1	1	1	40.0	110	70	96	4.2	9.6	219	0	60	70	0.70	n	42	1.1	0	0	0	0	1	0
18	12/4/1	4F	0.00	0	0	1	1	1	38.6	120	80	100	12.9	6.2	122	0	98	74	0.20	n	51	1.5	0	0	0	0	0	0
19	12/4/2	1F	0.00			1	0	1	38.0	120	70	97	13.2	6.3	134	0	78	56	0.22	n	34	0.9	0	0	0	0	0	0
20	12/4/3	1F	0.00			0	1	0	37.0	110	70	100	11.9	5.8	136	0	80	64	0.30	n	32	0.8	0	0	0	0	0	0
21	12/4/4	0	0.00	0	84	0	0	0	36.4	100	70	103	12.3	6.0	145	0	55	34	0.05	n	23	0.6	0	0	0	0	0	0
22	13/2/1	3V	155.21			1	1	0	39.4	110	80	108	15.3	6.4	127	0	24	27	0.90	n	15	0.4	0	0	0	0	0	0
23	13/2/2	1V	14.26			0	1	0	36.0	120	80	87	15.0	6.8	144	0	13	23	0.90	n	24	0.8	0	0	0	0	0	0
24	14/2/1	1F+G	270.94			1	1	1	38.0	110	80	128	7.3	3.9	167	0	17	15	0.45	n	19	0.5	0	0	0	1	1	0
25	14/2/2	1F	665.61			0	0	0	36.0	100	60	105	8.4	4.2	175	0	12	18	0.34	n	20	0.6	0	0	0	0	0	0

No	No pend/ sampel	PAR spp	TNF pg/ml	D.hambat		Keluhan			Panas t	Tensi		Hipo glikem ia	Hb g%	Le ko sit	Trom bo sit	Fungsi hati			Fungsi ginjal									
				G5	L5	de- mang	nyeri kep/ru	sist		dias	SGOT					SGPT	Bil	war na	Ure	Kre	Red	Bil	Uro	Leu	Eri			
																										na	Ure	Kre
26	15/2/1	1F+G				1	1	1	36.5	110	80	161	11.5	9.6	175	0	10	15	0.51	n	30	0.4	0	0	0	0	0	0
27	15/2/2	1F	20.19			0	1	0	36.0	110	80	100	12.3	8.7	160	0	12	23	0.70	n	29	0.3	0	0	0	0	0	0
28	16/2/1	4V	5.36			1	0	1	37.6	100	70	158	11.3	7.5	170	0	40	25	0.93	n	18	0.5	0	0	0	0	0	0
29	16/2/2	1V+G	0.00			0	0	0	36.0	120	80	123	12.5	7.3	189	0	13	20	0.70	n	33	0.2	0	0	0	0	0	0
30	17/1/1		0.00																									
31	18/2/1	1F	103.28			1	1	1	36.4	120	80	60	12.8	8.4	178	0	20	17	0.50	n	30	0.7	0	0	0	0	0	0
32	18/2/2	1F	164.11			0	0	0	36.0	110	80	60	15.9	8.8	168	0	16	27	0.50	n	26	0.8	0	0	0	0	0	0
33	19/2/1	4F	11.29			1	1	0	36.4	120	70	78	15.3	21.6	147	0	18	36	0.52	n	24	0.5	0	0	0	0	0	0
34	19/2/2	2F+G	468.27			1	0	0	36.0	110	70	109	14.5	17.9	187	0	10	17	0.40	n	17	0.5	0	0	0	0	0	0
35	20/2/1	1F	2843.70			1	0	1	36.0	110	70	98	13.6	3.9	178	0	69	77	0.50	n	38	1.2	0	0	0	0	0	0
36	20/2/2	1F	3057.36			1	0	1	38.0	110	70	98	14.1	4.2	187	0	13	23	0.70	n	44	0.6	0	0	0	0	0	0
37	21/2/1	1F	132.95			1	1	1	38.6	120	80	76	9.4	6.0	198	0	32	20	0.90	n	17	0.4	0	0	0	0	0	0
38	21/2/2	1F	144.82			1	0	1	36.2	120	80	87	11.3	7.0	199	0	12	23	0.70	n	34	0.7	0	0	0	0	0	0
39	22/1/1	1F+4G	0.00			1	0	0	39.0	100	50	132	8.4	12.7	174	0	170	120	4.76	n	513	7.5	0	0	0	0	0	0
40	23/2/1	1F	18.71			1	1	1	39.0	120	60	93	11.1	3.9	179	0	22	17	0.46	n	33	1.1	0	0	0	0	0	0
41	23/2/2	1F	8.32			0	0	0	36.0	110	70	99	12.3	6.8	198	0	21	12	0.35	n	24	0.3	0	0	0	0	0	0
42	24/2/1	4F	81.02			1	1	1	39.8	110	70	118	13.2	13.8	189	1	45	57	12.50	n	103	2.5	0	0	0	0	0	0
43	24/2/2	4F+G	61.74			1	1	1	39.5	120	80	134	12.6	6.6	178	1	33	25	0.55	n	43	0.7	0	0	0	0	0	0
44	25/2/1	1F+2G	739.79			1	0	0	38.4	140	90	236	11.2	4.2	124	0	48	49	1.74	n	19	0.5	0	0	0	0	0	0
45	25/2/2	1F+2G	1238.32			0	0	0	37.0	130	80	136	10.7	4.7	188	0	38	35	0.74	n	30	0.4	0	0	0	0	0	0
46	26/2/1	1F+G	124.05			1	1	1	38.0	110	50	132	8.4	12.7	212	1	170	130	4.79	n	513	7.5	0	1	0	0	0	0
47	26/2/2	4F+4G	0.00			1	0	1	37.2	90	60	100	7.6	13.8	177	1	160	142	4.80	n	400	6.4	0	1	0	0	0	0
48	27/3/1	1F+G	70.64			1	0	0	38.0	110	70	66	11.2	5.6	177	0	27	29	0.40	n	21	0.9	0	0	0	0	0	0
49	27/3/2	1F+G	58.77			0	0	0	36.0	130	80	84	12.8	3.9	180	0	39	49	0.63	n	19	0.5	0	0	0	0	0	0
50	27/3/3	0	17.23			0	0	0	36.0	110	70	74	12.0	5.2	179	0	20	25	0.50	n	20	0.6	0	0	0	0	0	0
51	28/3/1	4V	5.36	25	12	1	1	1	39.0	110	80	84	10.0	5.9	207	1	37	71	2.52	n	39	1.3	0	0	0	0	0	0

No	No pend/ sampel	PAR spp	TNF pg/ml	D.hamba		Keluhan			Panast	Tensi		Hipo glikemia	Hb g%	Le Rosit	Trombosit	Fungsi hati				Warna	Fungsi ginjal							
				G5	L5	demam	nyeri	kep		n/v	sist					dias	ikt	SGOT	SGPT		BILI	na	Ure	Kre	Ret	Bili	Urd	Leu
52	28/3/2	4V	17.23			0	0	0	36.0	120	80	82	10.5	5.9	191	0	24	60	1.97	n	28	0.9	0	0	0	0	0	0
53	28/3/3	1V	0.00	0	75	0	0	0	36.0	110	70	82	10.3	6.2	207	0	24	50	0.70	n	27	0.7	0	0	0	0	0	0
54	29/3/1	4F	23.16	0	0	1	1	0	39.0	110	70	97	12.2	12.2	212	1	13	20	0.60	n	30	0.4	0	0	0	0	0	0
55	29/3/2	1F+G	20.19			0	0	0	36.4	100	70	100	10.3	8.8	198	1	13	20	0.70	n	37	0.5	0	0	0	0	0	0
56	29/3/3	1F+G	3.87	9	0	0	0	0	36.0	100	70	82	11.0	10.4	188	0	17	18	0.50	n	30	0.5	0	0	0	0	0	0
57	30/1/1	4F	39.48						37.0	110	70	104	10.0	10.1	198	0	22	12	0.24	n	20	0.7	0	0	0	0	0	0
58	31/3/1	4F	17.23	0	0	1	1	1	38.0	120	80	99	9.3	6.4	177	0	29	35	1.93	n	27	0.5	0	0	0	0	0	0
59	31/3/2	0	24.64			0	0	0	38.0	110	70	103	9.2	5.7	197	0	16	26	0.94	n	23	0.6	0	0	0	0	0	0
60	31/3/3	0	3.87	0	26	0	0	0	36.0	110	70	77	9.8	7.3	212	0	27	18	0.50	n	19	0.3	0	0	0	0	0	0
61	32/3/1	1F+G	61.74	0	0	1	0	0	37.8	120	70	86	9.2	6.0	209	0	13	10	0.97	n	20	0.3	0	0	0	0	0	0
	32/3/2	G	49.87			0	0	0	36.6	110	70	86	9.8	6.9	200	0	20	16	0.80	n	28	0.4	0	0	0	0	0	0
63	32/3/3		20.19	0	16																							
64	33/3/1	1F	73.61	68	35	1	0	1	36.2	100	60	73	14.7	6.2	175	0	25	37	1.03	n	15	0.5	0	0	0	0	0	0
65	33/3/2	0	88.44			1	0	0	38.0	100	60	80	14.0	4.7	187	0	30	21	1.00	n	20	0.7	0	0	0	0	0	0
66	33/3/3	0	0.00	0	60	0	0	0	37.2	110	70	95	12.9	3.9	191	0	47	25	0.33	n	23	0.6	0	0	0	0	0	0
67	34/2/1	1V	943.06						37.0	110	70	100	11.7	6.4	202	0	40	36	0.90	n	37	0.9	0	0	0	0	0	0
68	34/2/2	0	12.77						36.0	100	60	79	13.6	7.3	188	0	28	30	0.74	n	33	0.6	0	0	0	0	0	0
69	35/2/1	1F+1V	0.00			1	1	1	37.2	110	70	78	10.6	6.8	198	0	20	27	0.92	n	20	0.8	0	0	0	0	0	0
70	35/2/2	0	3.87			0	1	1	37.2	110	70	78	12.4	6.3	210	0	8	11	0.72	n	22	0.8	0	0	0	0	0	0
71	36/1/1																											
72	37/1/1	1F+G	2.39			0	1	1	36.5	110	70	139	7.3	9.4	234	0	13	22	0.43	n	76	2.3	0	0	0	0	0	0
73	38/2/1	4F+G	1483.13			1	0	0	37.4	100	60	96	8.8	6.0	211	0	30	17	1.66	n	22	0.7	0	0	0	0	0	0
74	38/2/2	1F+G	1980.18			0	0	0	36.0	120	80	100	9.2	6.3	200	0	20	15	0.80	n	20	0.4	0	0	0	0	0	0
75	39/1/1		0.00																									
76	40/2/1	4F	0.00			1	1	1	39.5	120	80	100	11.8	7.0	225	1	39	55	4.21	n	28	1.1	0	0	1	0	0	0
77	40/2/2	0	9.81			0	0	0	36.4	120	70	86	12.4	6.2	202	0	26	30	1.60	n	24	0.8	0	0	1	0	0	0

No	No pend/ sampel	PAR spp	TNF pg/ml	D.hambas		Keluhan			Panas t	Tensi		Hipo glikemia	Hb g%	Le ko sit	From bo sit	Fungsi hati				war na	Fungsi ginjal						
				G5	L5	de- mam	nyeri kepala	sist		dias	ikt					SGOT	SGPT	Bill	Ure		Kre	Red	Bill	Ure	Leu	Eri	
78	41/1/1	2V	0.00			0	0	0	37.5	110	70	90	11.6	9.9	190	1	13	19	6.30	n	24	0.8	0	0	1	0	0
79	43/2/1	1F+1G	0.00			1	0	1	38.0	120	80	88	11.0	6.8	211	0	33	34	0.85	n	27	0.8	0	0	0	0	0
80	43/2/2	0	15.74			1	0	1	37.0	110	60	97	12.4	5.6	200	0	22	30	0.70	n	22	0.7	0	0	0	0	0
81	44/1/1	2V	775.40			1	1	0	36.0	110	70	108	13.2	6.5	155	0	45	85	0.30	n	30	1	0	0	0	0	0
82	45/1/1	1F+G	772.44			1	0	0	37.6	100	60	100	11.7	5.7	178	0	13	23	0.40	n	24	0.2	0	0	0	0	0
83	46/1/1	1V	20.19			1	0	1	38.2	100	60	122	11.2	6.7	211	0	22	27	0.90	n	22	0.7	0	0	0	0	0
84	47/1/1	1F+1V	30.58			0	0	0	38.3	100	70	112	10.8	6.8	200	0	22	27	0.65	n	27	0.6	0	0	0	0	0
85	48/1/1	1F1VGG										89	11.3	6.4	200		30	27	0.72	n	23	0.6	0	0	0	0	0
86	49/3/1	1F				1	1	1	36.0	110	70	98	16.6	9.6	198	0	11	32	0.30	n	32	1.1	0	0	0	0	0
87	49/3/2	0				0	0	0	36.5	180	110	87	15.4	8.8	200	0	17	22	0.70	n	30	0.6	0	0	0	0	0
88	49/3/3	0				0	0	0	36.0	200	100	103	15.7	9.3	200	0	11	17	0.90	n	24	0.2	0	0	0	0	0
89	50/2/1	2V	30.58			1	1	0	37.0	100	70	89	11.6	8.3	184	0	11.6	23	0.70	n	27	0.7	0	0	0	0	0
90	50/2/2	0	43.93			0	0	0	36.0	100	70	110	12.1	6.1	184	0	28	27	0.20	n	20	0.5	0	0	0	0	0
91	51/2/1	2F							38.0	100	60	108	14.3	14.8	178	0	11	10	0.56	n	20	0.2	0	0	0	0	0
92	51/2/2	1F							36.0	120	80	100	14.3	14.8	182	0	11	10	0.56	n	20	0.4	0	0	0	0	0
93	52/3/1	3F+G		0	19	1	1	1	38.0	90	60	126	8.6	6.0	215	1	25	43	1.28	n	18	0.5	0	0	0	0	0
94	52/3/2	0				1	1	1	36.0	120	80	83	10.6	7.8	200	1	23	24	0.69	n	22	0.6	0	0	0	0	0
95	52/3/3	0		9	23	0	0	0	37.0	110	70	103	12.5	7.2	202	0	11	23	0.50	n	20	0.2	0	0	0	0	0
96	53/1/1	1F+1G				1	0	1	38.0	140	90	103	8.5	4.4	202	1	59	45	8.32	n	37	1.3	0	1	0	0	0
97	54/2/1	1F+G				1	1	1	37.5	110	70	94	6.1	5.7	105	0	10	12	0.37	n	17	0.8	0	0	0	0	1
98	54/2/2	0				0	1	1	37.0	100	60	99	8.4	10.4	177	0	12	14	0.26	n	20	0.7	0	0	0	0	0
99	55/3/1	2F+G				1	1	1	38.0	110	70	141	7.9	7.5	205	0	13	24	0.96	n	48	0.2	0	0	0	0	0
100	55/3/2	1F+G				1	1	1	36.0	100	60	103	8.4	7.9	202	0	12	23	0.56	n	24	0.2	0	0	0	0	0
101	55/3/3	0				0	0	0	37.0	110	70	107	12.0	6.7	212	0	10	8	0.40	n	18	0.2	0	0	0	0	0
102	56/3/1	4V		23	61	1	1	0	38.0	100	60	71	10.0	7.5	162	1	23	34	4.47	n	28	1.2	0	1	0	0	0

No	No pend/ sampel	PAR app	TNF pg/ml	D.hambar		Keluban			Panas t	Tensi		Hipo gluke mia	Hb g%	Le ko sit	Trom bo sit	Fungsi hati			Fungsi ginjal									
				G5	L5	de- mam	tyeri kepa/v	sist		dias	ikt					SGOT	SGPT	Bill	war na	Ure	Kre	Rec	Bill	Ure	Leu	Eri		
																											na	na
103	56/3/2	0				0	1	0	36.5	110	70	70	11.0	7.5	161	0	34	40	2.45	n	24	1.3	0	0	0	0	0	0
104	56/3/3	0		34	42	0	0	0	36.0	120	80	98	12.7	8.1	177	0	23	13	0.90	n	20	0.6	0	0	0	0	0	0
105	57/1/1	4F				1	1	1	38.0	110	70	100	9.5	5.3	211	0	23	33	0.50	n	28	0.7	0	0	0	0	0	0
106	A/1											98	14.8	6.2	200		12	20	0.50	n	17	0.3						
107	A/02											117	13.1	7.2	198		8	11	0.40	n	16	0.1						
108	A/03											99	12.3	5.5	202		17	21	0.70	n	30	0.4						
109	A/04											89	11.9	7.2	211		25	20	0.70	n	20	0.7						
110	A/05											112	14.2	7.9	217		27	18	0.90	n	34	0.7						
111	A/06											88	13.2	5.8	207		18	27	0.50	n	18	0.2						
112	A/07											113	12.4	6.4	198		12	16	0.40	n	36	0.3						
113	A/08											98	13.7	7.2	190		10	17	0.40	n	24	0.3						
114	A/09											100	12.7	6.5	212		20	23	0.70	n	30	0.7						
115	A/10											116	13.2	7.5	199		11	18	0.60	n	33	0.6						
116	A/11											117	14.1	8.1	212		20	27	0.60	n	20	0.4						
117	A/12											106	11.4	6.2	180		20	11	0.60	n	17	0.2						
118	A/13											80	12.4	7.4	197		8	11	0.60	n	40	0.7						
119	A/14											107	12.6	6.8	180		11	17	0.60	n	25	0.4						
120	A/15											98	11.5	6.7	189		8	12	0.40	n	20	0.3						
121	A/16											89	12.5	7.5	179		18	12	0.70	n	23	0.3						
122	A/17											102	14.2	5.6	200		12	16	0.40	n	32	0.4						
123	A/18											96	12.1	6.3	180		20	17	0.60	n	24	0.2						
124	A/19											88	13.8	6.9	189		20	24	0.70	n	36	0.4						
125	A/20											110	12.8	6.7	225		27	22	0.80	n	24	0.3						
126	A/21											100	11.7	5.6	191		21	17	0.70	n	27	0.3						
127	A/22											89	13.2	6.7	212		8	11	0.50	n	21	0.2						
128	A/23											79	12.7	6.8	176		17	14	0.40	n	27	0.3						
129	A/24											88	12.1	6.3	193		6	8	0.40	n	20	0.4						
130	X																											

Lampiran 2
Data penderita Puskesmas Gangga dan Tanjung

No	No kode	Umur	Sex	Par1	Par2	Par3	Par4
1	8	17	L	V3 ^{WV}		NEG	
2	9	15	L	F4	NEG		
3	11	20	L	F1	NEG		
4	14	22	P	NEG	F2 M1	F1/V1	V1?
5	15	18	P	F2	NEG	NEG	
6	16	15	L	F2	NEG		
7	17	13	P	F1	NEG	NEG	
8	18	13	L	V3	V3	V2	
9	19	16	P	F3	DO	V1	
10	20	44	L	F3	DO	NEG	
11	21	25	P	F4G1	DO	NEG	
12	23	19	L	F3	NEG	NEG	
13	24	55	P	F3G1	F1/V1	DO	
14	25	20	P	F2G1	V3	V2G1/F1	
15	26	32	P	NEG	DO	DO	
16	27	25	L	F2		NEG	
17	28	15	P	F1G1	F1G1	F2G1/V1	
18	29	26	L	V1	V1	DO	
19	30	50	P	F3G1	F3G1	F1	

Keterangan :

- L - laki-laki
 PAR - jenis parasit yang ditemukan
 F - *P. falciparum*
 V - *P. vivax*
 DO - drop out, tidak berhasil diambil sampel darahnya.
 NEG - negatif, tidak ditemukan parasit
- P - perempuan
 G - gametosit
 M - merozoit

Lampiran 3

ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*) UNTUK MENGUKUR KADAR TNF :

Digunakan kit *Pelikine Compact human TNF- α ELISA kit* buatan *Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam*.

Prinsip reaksi :

Test ini merupakan reaksi "*sandwich*" di mana TNF- α di dalam sampel ditangkap oleh *monoclonal anti-human TNF- α antibody* yang berada pada dasar sumur (telah di-"*coating*" sehari sebelumnya). Sesudah pencucian untuk membersihkan sisa-sisa bahan lain yang tidak ditangkap oleh antibodi, ditambahkan antibodi monoklonal kedua terhadap TNF- α yang terikat tadi. Antibodi kedua ini telah dikonjugasi dengan *biotin*. Kemudian ditambahkan *streptavidin* yang di label dengan enzim *horse-shoe radish peroxidase (HRP)*. Adanya enzim akan menyebabkan perubahan warna pada substrat. Reaksi enzimatik ini dihentikan pada waktu yang dikehendaki dengan pemberian *stop-solution*. Perubahan warna dibaca dalam *ELISA reader*.

Metoda :

1. *Coating* sumur-sumur pada *microtiter plate* dengan 100 ul antibodi terhadap TNF yang telah diencerkan 100 kali dengan *coating buffer* (0,1 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9,6).
2. Inkubasi semalam (i.k. 15 jam) pada suhu kamar (18-25 °C).
3. Pencucian sumur-sumur dengan PBS (*phosphate buffered saline* pH 7,2).
4. Dibubuhkan 200 ul *blocking buffer* yang berisi larutan 2% BSA (*bovine serum albumin*) dalam PBS, inkubasi 60 menit dalam suhu kamar.
5. Setelah pencucian dengan *washbuffer* (PBS ditambah 0,005% Tween -20), dibubuhkan 100 ul sampel serum.

Simultan dengan sampel penderita, juga dibubuhkan ke dalam deretan sumur-sumur standard, 100 ul larutan TNF- α standard (stok berisi 7000 pg/ml) yang telah diencerkan dalam "*serial dilution*".

Inkubasi 60 menit dalam suhu kamar.

6. Setelah pencucian dengan *washbuffer*, dibubuhkan 100 ul *biotinylated-TNF- α antibody* yang telah diencerkan 100 kali dalam *dilution buffer* (larutan 2% BSA dalam PBS) lalu diinkubasi 60 menit dalam suhu kamar.
7. Dicuci dengan *washbuffer*, lalu dibubuhkan 100 ul *Streptavidine-HRP (horse-shoe radish peroxidase) conjugate* yang telah diencerkan 10.000 kali dalam *dilution buffer*. Inkubasi 30 menit dalam suhu kamar.
8. Cuci, lalu tambahkan 100 ul substrat yang telah disiapkan 10 menit sebelumnya

Substrat terdiri dari :

12ml *substrate buffer* (0,11 M acetate buffer pH 5,5).

200 ul TMB *stock solution*:

30mg 3,5,3',5'-*tetramethylbenzidine* dalam 5 ml DMSO

12 ul H₂O₂ stock (3%).

9. Inkubasi 30 menit di dalam gelap dengan suhu kamar
10. Dibubuhkan 100 ul stop-solutin (H_2SO_4 1,8 M).
11. Dibaca dalam *ELISA-reader* dengan panjang gelombang 450 nm.
12. Penghitungan konsentrasi TNF dalam sampel disesuaikan dengan standard.

Catatan : Sensitivitas : 1-3 pg/ml.

Harga TNF-a dalam serum dan plasma orang sehat berada di bawah 10 pg/ml.

Lampiran 4

PEMBIAKAN PARASIT MALARIA :

Tujuan: koleksi dan multiplikasi parasit malaria dari masing-masing penderita untuk memperoleh jumlah yang cukup untuk pembuatan antigen dan stok parasit

Cara

1. Pemiakan dilakukan dengan metoda Trager and Jensen (1976).
2. Medium yang digunakan:

Medium stok :	
- RPMI-1640 with L-glutamin, without NaBic	10,4 g
- Hepes buffer	5,94 g
- Gentamycin 10 mg/ml	2,5 ml
- Double distilled water	960 ml
3. Setiap kali akan digunakan, ditambahkan 4,2 ml Na Bicarbonas 5% per 100 ml medium stok dan 10% (11,5 ml) *normal human serum*.
4. PH akhir dari medium jadi, harus berada di sekitar 7,2.
5. Sebagai hospes parasit, digunakan sel darah merah dari orang sehat dengan golongan darah sesuai atau komplementer dengan sel darah merah penderita atau sel darah merah yang digunakan sebelumnya serta serum yang akan digunakan. Konsentrasi sel darah merah dibanding medium biasanya 1:10.
6. Digunakan *culture flask* buatan Gibco, BRL.
7. Inkubasi dalam inkubator 5% CO_2 atau *candle jar*, dengan suhu 37 °C.
8. Medium diganti setiap hari. Evaluasi pertumbuhan parasit dilakukan dengan membuat hapusan dari pelet yang telah diaduk rata, lalu difiksasi dan diwarnai dengan Giemsa atau Acridine Orange. Tingginya parasitemia dihitung per 100 sel darah merah di daerah/lapangan pandangan yang mempunyai distribusi representatif.
9. Seluruh medium dan komponennya dalam keadaan steril. Penggantian medium dan sebagainya dilakukan di dalam *laminar flow* atau *clean bench*

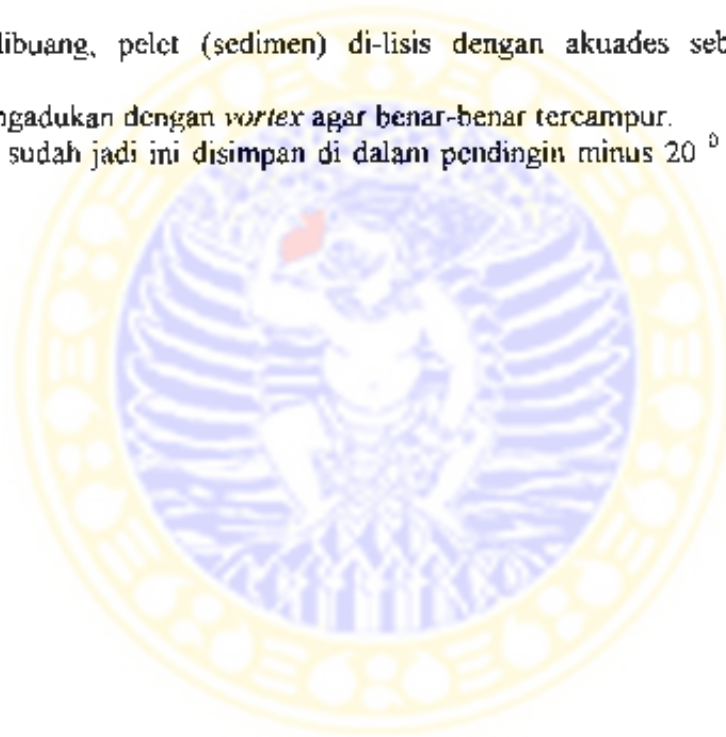


Lampiran 5**PEMBUATAN ANTIGEN MALARIA :**

Tujuan : memperoleh antigen untuk digunakan dalam stimulasi monosit untuk memproduksi TNF- α .

Metode:

1. Pembuatan antigen sesuai dengan penelitian sejenis yang dilakukan oleh Bate, *et al.* (1994a).
2. Bahan berasal dari biakan *P. falciparum* yang mengandung mayoritas stadium sizon dan trofozoit dengan parasitemia sekitar 10%.
3. Seluruh biakan dipindahkan ke tabung untuk di-sentrifuge 10.000 g selama 10 menit.
4. Supernatan dibuang, pelet (sedimen) di-lisis dengan akuades sebanyak 4 kali volume pelet.
5. Dilakukan pengadukan dengan *vortex* agar benar-benar tercampur.
6. Antigen yang sudah jadi ini disimpan di dalam pendingin minus 20 °C sampai saat digunakan.



Lampiran 6

PEMBIAKAN MONOSIT :

Tujuan : Memperoleh sel monosit dalam jumlah yang cukup untuk digunakan dalam percobaan stimulasi produksi TNF-a.

Metode :

1. Digunakan Monomac 6, sebuah cell line monosit yang telah banyak digunakan untuk penelitian sejenis (Bate 1994a, Bate 1994b, Picot 1993)
2. Medium yang digunakan :

- RPMI cair tanpa glutamin, sudah mengandung Natrium bicarbonas (Flow lab)	95 ml
- Penstrep 100 u/100 ug/ml	1 ml
- l-Glutamin 1%	1 ml
- Hepes	2 ml
- Serum normal (human)	5 ml
3. Digunakan *culture flask* dari Costar Laboratory.
4. Setelah dicairkan dari simpan-beku, sel Mono Mac-6 segera dicuci dengan medium (dengan dicampur dan kemudian dipisahkan) untuk membuang sisa-sisa bahan pengawet (DMSO) agar tidak merusak.
5. Kemudian pelet dipindahkan ke dalam tabung kultur dan ditambah dengan 1.k. 10 kali volume medium.
6. Inkubasi di dalam inkubator dengan CO₂ 5%, 37^o C.
7. Medium diganti tiap hari dengan cara pencucian dengan sentrifugasi. Pencampuran medium diusahakan selalu dilakukan dekat/menjelang akan digunakan agar pH tidak berubah. PH diatas 7,6 akan mengganggu pertumbuhan monosit.
8. Evaluasi pertumbuhan dilakukan dengan melihat secara visual dengan mikroskop akan tanda-tanda viabilitas dan kepadatan sel, dengan mentes viabilitas, dan dengan penghitungan jumlah atau kepadatan sel.
9. Viabilitas sel di-cek dengan menggunakan larutan 0.2% trypan-blue 1 l. Penghitungan jumlah atau kepadatan sel dilakukan dengan menggunakan larutan Turk 1:10 dan kamar hitung Neubauer.
10. Diusahakan agar konsentrasi sel tidak melebihi 10⁵ per mililiter medium dan viabilitas selalu di atas 90%.

Lampiran 7

STIMULASI MONOSIT DENGAN ANTIGEN MALARIA DAN KOLEKSI SUPERNATAN YANG MENGANDUNG TNF- α :

Tujuan :

1. Mengetahui adanya produksi TNF- α .
2. Mencari perbandingan ideal/optimal antara jumlah/konsentrasi monosit dan jumlah/konsentrasi antigen malaria agar menghasilkan stimulasi yang maksimal.
3. Melihat kurve kinetik produksi TNF- α .
4. Dari butir 2 dan 3 akan ditentukan sistim yang terbaik untuk digunakan dalam percobaan inhibisi oleh serum penderita.

Metoda :

1. Dilakukan dengan metoda yang digunakan oleh Bate dkk. (1994a) dan Picot dkk. (1993) dengan beberapa modifikasi sesuai dengan hasil penelitian preliminary.
2. Biakan sel Mono Mac-6 seperti di atas, dipanen, dicuci dengan medium, lalu disuspensikan kembali dengan medium dan dihitung jumlah selnya.
3. Kemudian diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan dan ditambah dengan forbol myristat asetat (PMA) 100 ng per ml dan diinkubasi selama 1 jam untuk aktivasi.
4. Setelah pencucian, sel-sel disuspensikan kembali dengan medium lengkap (RPMI 1640 mengandung 5% serum orang normal) sesuai dengan konsentrasi sel yang dibutuhkan.
5. Sel didistribusikan ke dalam sumur-sumur culture plate.
6. Dibubuhkan antigen dengan pengenceran sesuai dengan yang dibutuhkan.
7. Digunakan beberapa sumur untuk kontrol negatif dan kontrol positif.
Kontrol negatif : suspensi monosit tidak dibubuhi antigen.
Kontrol positif : dibubuhi LPS (sediaan LPS/lipopolisaccharida dari E. Coli) dengan konsentrasi 100 ng/ml untuk 10^6 monosit/ml.
8. Inkubasi di dalam inkubator CO2 5%.
9. Sesuai dengan kurun waktu yang ditentukan, supernatan dari masing-masing sumur diunduh dengan cara aspirasi hati-hati dengan pipet. Supernatan dimasukkan ke dalam microtube/Eppendorf dingin.
Sisa-sisa sel dibuang dengan cara dipusingkan dalam keadaan dingin (10.000 rpm, 5 menit, 4^o C).
10. Supernatan yang telah bersih disimpan dalam minus 20^o C sampai saat diukur kadar TNF- α nya.

Lampiran 8**PENGUKURAN DAYA HAMBAT SERUM PENDERITA TERHADAP PRODUKSI TNF (*Inhibition Assay*)**

Tujuan : Mengetahui adanya dan mengukur besarnya daya inhibisi/hambat dari serum penderita malaria terhadap produksi TNF pada biakan monosit yang distimulir antigen malaria.

Metoda :

1. Dilakukan prosedur seperti yang dijalankan pada stimulasi biakan monosit dengan antigen malaria (bab 2).
2. Sebelum membubuhkan antigen, dibubuhkan terlebih dahulu serum penderita yang telah di-inaktivasi 54 °C selama 30 menit.
3. Jumlah serum penderita yang dibubuhkan disesuaikan dengan derajat pengenceran/prosentasi serum yang direncanakan, dan disubstitusikan dalam hitungan konsentrasi serum yang diperlukan untuk biakan monosit agar monosit tetap dalam keadaan optimal (sehat).
4. Sesudah serum dibubuhkan, baru antigen ditambahkan.
5. Digunakan beberapa sumur kontrol, yaitu :
 - Kontrol negatif : hanya menggunakan medium dan serum orang normal sebagai kelengkapan medium untuk memelihara viabilitas monosit.
 - Kontrol positif stimulasi : dibubuhi antigen dan serum orang normal.
 - (Sedangkan sumur uji daya hambat : dibubuhi serum penderita, antigen malaria, dan serum orang normal sebagai substitusi volume.

Lihat gambar!
6. Bisa direncanakan dan dilakukan sebuah "checker-board" untuk memilih perbandingan konsentrasi antigen-serum penderita yang optimal.
7. Hasil produksi TNF dalam supernatan dikoleksi dalam kurun waktu optimal sesuai dengan kurve kinetik yang telah diperoleh sebelumnya, lalu disimpan dalam suhu -20 °C.
8. Perhitungan daya inhibisi dengan cara persentasi dibandingkan dengan sumur kontrol, yaitu sumur yang diberi stimulasi antigen tetapi tidak dibubuhi serum penderita.

Daya hambat dinyatakan dalam persen seperti rumus di bawah ini :

Daya hambat =

$$\frac{\text{Kadar TNF dalam sumur kontrol} - \text{kadar TNF dalam sumur sampel}}{\text{Kadar TNF dalam sumur kontrol}} \times 100\%$$

Lampiran 9

APPENDIX 13.C. Total sample size required when using the correlation coefficient (r)

Table 13.C.
Sample size for revealing a correlation

r^1	One-tailed $\alpha =$ Two-tailed $\alpha =$ $\beta =$	0.005 0.01			0.025 0.05			0.05 0.10		
		0.05	0.10	0.20	0.05	0.10	0.20	0.05	0.10	0.20
0.05		7118	5947	4663	5193	4200	3134	4325	3424	2469
0.10		1773	1481	1162	1294	1047	782	1078	854	616
0.15		783	655	514	572	463	346	477	378	273
0.20		436	365	287	319	259	194	266	211	153
0.25		276	231	182	202	164	123	169	134	98
0.30		189	158	125	139	113	85	116	92	67
0.35		136	114	90	100	82	62	84	67	49
0.40		102	86	68	75	62	47	63	51	37
0.45		79	66	53	58	48	36	49	39	29
0.50		62	52	42	46	38	29	39	31	23
0.60		40	34	27	30	25	19	26	21	16
0.70		27	23	19	20	17	13	17	14	11
0.80		18	15	13	14	12	9	12	10	8

¹To estimate the total sample size, read across from r (the expected correlation coefficient) and down from the specified values of α and β .

General Formula for Other Values

The general formula for other values of r , α , and β is as follows (see Appendix 13.A for definitions of z_α and z_β). Let

r = expected correlation coefficient

$$C = 0.5 \times \ln [(1+r)/(1-r)]$$

N = Total number of subjects required

Then:

$$N = [(z_\alpha + z_\beta) + C]^2 + 3.$$

Estimating Sample Size for Difference between Two Correlations

If testing whether a correlation, r_1 , is different from r_2 (i.e., the null hypothesis is that $r_1 = r_2$; the alternative hypothesis is that $r_1 \neq r_2$), let

$$C_1 = 0.5 \times \ln [(1+r_1)/(1-r_1)]$$

$$C_2 = 0.5 \times \ln [(1+r_2)/(1-r_2)]$$

Then:

$$N = [(z_\alpha + z_\beta) + (C_1 - C_2)]^2 + 3.$$

Lampiran 10

Correlations pada seluruh penderita malaria di RSU (Pf & Pv)**Correlations**

		DERPAR	TNF	L5	SUHU	HB
DERPAR	Pearson Correlation	1.000	-.072	-.260	.346*	-.061
	Sig. (2-tailed)		.530	.369	.001	.551
	N	96	78	14	96	97
TNF	Pearson Correlation	-.072	1.000	-.256	-.148	.141
	Sig. (2-tailed)	.530		.476	.199	.222
	N	78	78	10	77	77
L5	Pearson Correlation	-.260	-.256	1.000	-.401	.250
	Sig. (2-tailed)	.369	.476		.174	.409
	N	14	10	14	13	13
SUHU	Pearson Correlation	.346*	-.148	-.401	1.000	-.167
	Sig. (2-tailed)	.001	.199	.174		.103
	N	96	77	13	96	96
HB	Pearson Correlation	-.061	.141	.250	-.167	1.000
	Sig. (2-tailed)	.551	.222	.409	.103	
	N	97	77	13	96	97
SGOT	Pearson Correlation	.088	.020	.390	.262*	-.206*
	Sig. (2-tailed)	.393	.864	.187	.010	.043
	N	97	77	13	96	97
SGPT	Pearson Correlation	.173	.043	.198	.226*	-.132
	Sig. (2-tailed)	.090	.707	.516	.027	.198
	N	97	77	13	96	97
BILI	Pearson Correlation	.223*	-.094	.159	.363**	-.098
	Sig. (2-tailed)	.028	.414	.603	.000	.340
	N	97	77	13	96	97
URE	Pearson Correlation	.042	-.062	-.165	.179	-.232*
	Sig. (2-tailed)	.680	.594	.589	.081	.022
	N	97	77	13	96	97
CRE	Pearson Correlation	.061	-.070	.350	.210*	-.237*
	Sig. (2-tailed)	.554	.547	.241	.040	.019
	N	97	77	13	96	97

Correlations pada penderita P. falciparum di RSU**Correlations**

		DERPAR	TNF	L5	SUHU	HB
DERPAR	Pearson Correlation	1.000	-.096	-.547	.328**	-.039
	Sig. (2-tailed)		.472	.102	.005	.743
	N	74	58	10	73	73
TNF	Pearson Correlation	-.096	1.000	-.115	-.173	.161
	Sig. (2-tailed)	.472		.787	.197	.232
	N	58	58	8	57	57
L5	Pearson Correlation	-.547	-.115	1.000	-.382	.524
	Sig. (2-tailed)	.102	.787		.339	.148
	N	10	8	10	9	9
SUHU	Pearson Correlation	.328**	-.173	-.382	1.000	-.217
	Sig. (2-tailed)	.005	.197	.339		.065
	N	73	57	9	73	73
HB	Pearson Correlation	-.039	.161	.524	-.217	1.000
	Sig. (2-tailed)	.743	.232	.148	.065	
	N	73	57	9	73	73
SGOT	Pearson Correlation	.069	-.029	.738*	.295*	-.221
	Sig. (2-tailed)	.565	.832	.024	.011	.060
	N	73	57	9	73	73
SGPT	Pearson Correlation	.120	-.001	.280	.289*	-.143
	Sig. (2-tailed)	.311	.996	.500	.013	.227
	N	73	57	9	73	73
BILI	Pearson Correlation	.189	-.099	-.397	.397**	-.091
	Sig. (2-tailed)	.110	.462	.290	.000	.446
	N	73	57	9	73	73
URE	Pearson Correlation	.036	-.090	-.510	.198	-.242*
	Sig. (2-tailed)	.760	.508	.161	.093	.039
	N	73	57	9	73	73
CRE	Pearson Correlation	.048	-.099	.305	.230	-.232*
	Sig. (2-tailed)	.686	.462	.425	.050	.049
	N	73	57	9	73	73

Correlations pada penderita *P. vivax* di RSU

Correlations

		DERPAR	TNF	L5	SUHU	HB
DERPAR	Pearson Correlation	1.000	-.027	-.359	.473*	-.170
	Sig. (2-tailed)	.	.919	.641	.035	.474
	N	20	17	4	20	20
TNF	Pearson Correlation	-.027	1.000	-1.000**	-.107	.144
	Sig. (2-tailed)	.919	.	.	.681	.581
	N	17	17	2	17	17
L5	Pearson Correlation	-.359	-1.000**	1.000	-.648	-.062
	Sig. (2-tailed)	.641	.	.	.352	.938
	N	4	2	4	4	4
SUHU	Pearson Correlation	.473*	-.107	-.648	1.000	.097
	Sig. (2-tailed)	.035	.681	.352	.	.684
	N	20	17	4	20	20
HB	Pearson Correlation	-.170	.144	-.062	.097	1.000
	Sig. (2-tailed)	.474	.581	.938	.684	.
	N	20	17	4	20	20
SGOT	Pearson Correlation	.242	.631**	-.838	.028	-.011
	Sig. (2-tailed)	.304	.007	.162	.908	.965
	N	20	17	4	20	20
SGPT	Pearson Correlation	.432	.437	-.377	-.044	-.069
	Sig. (2-tailed)	.057	.079	.623	.854	.771
	N	20	17	4	20	20
BILI	Pearson Correlation	.395	-.164	-.104	.262	-.164
	Sig. (2-tailed)	.085	.529	.896	.265	.491
	N	20	17	4	20	20
URE	Pearson Correlation	.072	.326	-.582	-.169	-.403
	Sig. (2-tailed)	.764	.201	.418	.476	.078
	N	20	17	4	20	20
CRE	Pearson Correlation	.271	.265	-.487	.096	-.515*
	Sig. (2-tailed)	.247	.304	.513	.689	.020
	N	20	17	4	20	20

Univariate Analysis of Variance kadar TNF pd sampel-2 ke 1,2,3

Between-Subjects Factors

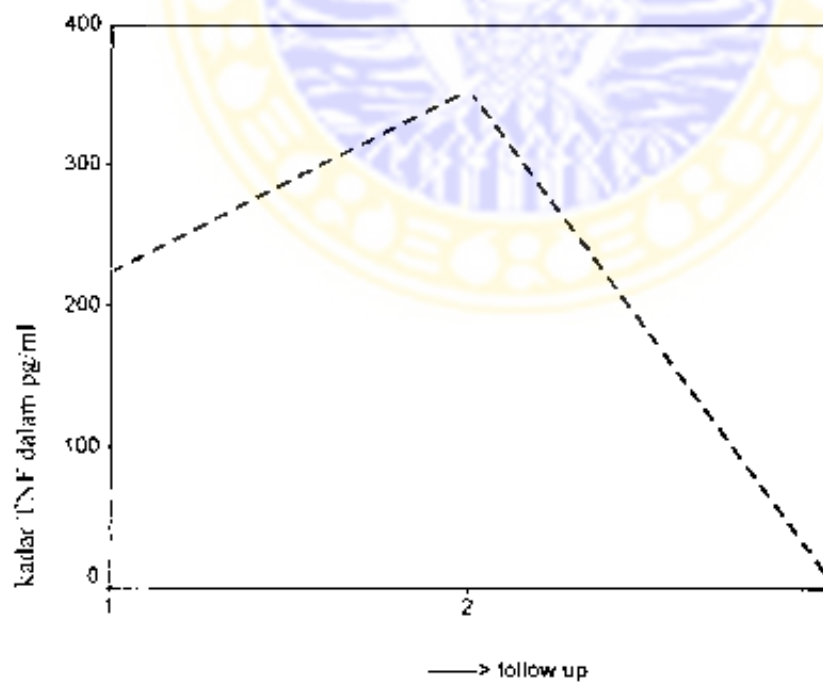
		N
KOL	1	42
	2	30
	3	6

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TNF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	700344.40 ^a	2	350172.20	.970	.384
Intercept	1524920.6	1	1524920.6	4.224	.043
KOL	700344.40	2	350172.20	.970	.384
Error	27075040	75	361000.53		
Total	32916007	78			
Corrected Total	27775384	77			

a. R Squared = .025 (Adjusted R Squared = -.001)



Correlations antara daya hambat terhadap antigen L5 dan G-2300

Correlations

		L5	G5
L5	Pearson Correlation	1.000	.451**
	Sig. (2-tailed)	.	.005
	N	38	38
G5	Pearson Correlation	.451**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.005	.
	N	38	38

** Correlation is significant at the 0.01 level

T-Test Mean daya hambat L5 pada P. faic (1) dan P.vivax (2)

Group Statistics

	FV	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
L5	1	27	15.51	16.43	3.16
	2	9	38.54	31.38	10.48

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
L5	Equal variances assumed	8.639	.006	-2.859	34	.007	-23.03	8.06	-39.40	-6.66
	Equal variances not assumed			-2.107	9.503	.063	-23.03	10.93	-47.55	1.49

Lampiran 11

Korelasi antara kadar Chloroquine, TNF dan derajat parasitemia.**Correlations**

		CHLOR	TNF	DERPAR
CHLOR	Pearson Correlation	1.000	.202	-.396**
	Sig. (2-tailed)	.	.189	.004
	N	52	44	52
TNF	Pearson Correlation	.202	1.000	-.067
	Sig. (2-tailed)	.189	.	.666
	N	44	44	44
DERPAR	Pearson Correlation	-.396**	-.067	1.000
	Sig. (2-tailed)	.004	.666	.
	N	52	44	52

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 12

EXPERIMENT 27 NOVEMBER 1998

L Goal : to determine suitable concentration of antigen (LO-2) for using in inhibition assays.

Serum Concentration : 5%

	Ag-	LO-2												G-2300			
		1:200				1:400				1:800				1:800			
		Ag +	Net val	Red val	% Red	Ag +	Net val	Red val	% Red	Ag +	Net val	Red val	% Red	Ag +	Net val	Red val	% Red
NHS	0.171	0.521			0.499				0.254				0.182				
	0.179	0.450			0.458				0.252				0.192				
	0.166	0.435			0.439				0.265				0.194				
Avg	0.172	0.469	0.297		0.465	0.293			0.257	0.085			0.189	0.017			
Pat's sera																	
15-2	0.093	0.472			0.41				0.332				0.226				
	0.184	0.482			0.407				0.25				0.187				
	0.180	0.537			0.448				0.307				0.214				
Avg	0.152	0.497	0.345	No Red	0.422	0.270	0.024	8%	0.296	0.144	No Red		0.209	0.057	No Red		
25-3	0.143	0.432			0.341				0.253				0.252				
	0.14	0.342			0.327				0.195				0.184				
	0.071	0.357			0.307				0.202				0.238				
Avg	0.118	0.377	0.259	0.038	0.325	0.207	0.086	29%	0.217	0.099	No Red		0.225	0.107	No Red		