

## **PENGARUH KOMBINASI *ANNONA MURICATA* DENGAN *ARTEMISININ-BASED COMBINATION THERAPY* (ACT) TERHADAP PERSENTASE LIMFOBLAS LIMPA DAN PARASITEMIA MENCIT YANG TERINFEKSI MALARIA**

Dwi Fatimah Sari<sup>1</sup>, R.A Kisdjamiatun RMD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Staf Pengajar Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang-Semarang, Telp. (024)76928010

### **ABSTRAK**

**Latar Belakang:** Terapi kombinasi dibutuhkan untuk melindungi obat malaria saat ini dan yang akan datang. Ada pendapat bahwa pengelolaan malaria serebral memerlukan terapi adjuvant. Belum diketahui efektivitas *A.muricata* sebagai adjuvant pada malaria serebral yang dinilai dari persentase limfoblas limpa mencit *Swiss* yang diinokulasi PbA.

**Tujuan:** Membuktikan pengaruh kombinasi *A.muricata* dengan ACT terhadap persentase limfoblas limpa yang terinfeksi malaria.

**Metode:** Penelitian eksperimental laboratorium murni dengan *Post Test Only Control Group Design*. Sampel 20 ekor mencit *Swiss* dengan kriteria tertentu, dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok K diberi air. Kelompok P1 diberi *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/hari untuk pencegahan dan 6.24 mg/KgBB/hari untuk pengobatan. Kelompok P2 diberi ACT 0.546 mg/KgBB/hari. Kelompok P3 diberi *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/hari untuk pencegahan dan 6.24 mg/KgBB/hari untuk pengobatan dan ACT 0.546 mg/KgBB/hari. Hari ke-21 diambil darah ekor untuk mengukur parasitemia dan diterminasi untuk isolasi splenosit untuk mengukur persentase limfoblas limpa. Uji statistik menggunakan uji One-Way ANOVA dan uji Post-Hoc untuk limfoblas limpa serta uji Kruskal Wallis dan uji Mann Whitney untuk persentase parasitemia.

**Hasil:** Rata - rata persentase limfoblas limpa kelompok K (26.7%), P1 (17.38%), P2 (11.142%), P3 (7.546%). Perbedaan yang signifikan terdapat pada kelompok K-P1 ( $p=0.007$ ), K-P2 ( $p=0.000$ ), K-P3 ( $p=0.000$ ), P1-P3 ( $p=0.005$ ). Kelompok P1-P2 ( $p=0.056$ ) dan P2-P3 ( $p=0.253$ ) tidak ada perbedaan. Persentase parasitemia terdapat perbedaan antara kelompok K-P2 ( $p=0.009$ ), K-P3 ( $p=0.009$ ), P1-P2 ( $p=0.009$ ), P1-P3 ( $p=0.009$ ). Tidak terdapat perbedaan persentase parasitemia antara kelompok K-P1 ( $p=0.465$ ) dan P2-P3 ( $p=0.209$ ).

**Simpulan:** Pengaruh kombinasi *A.muricata* dengan ACT terhadap persentase limfoblas limpa yang terinfeksi malaria tidak bermakna.

**Kata kunci:** *A.muricata*, ACT, limfoblas limpa, PbA.

### **ABSTRACT**

**THE EFFECT OF THE COMBINATION OF *ANNONA MURICATA* AND *ARTEMISININ-BASED COMBINATION THERAPY* (ACT) TOWARD THE PERCENTAGE OF SPLENIC LYMPHOBLAST AND PARASITAEMIA OF MICE INFECTED BY MALARIA**

**Background:** Combination therapy is needed to protect antimalarial drugs at the time and in the future. There is an opinion stating that management of cerebral malaria needs adjuvant therapy. The effectivity of *A.muricata* as an adjuvant in cerebral malaria assessed from the percentage of splenic lymphoblast of Swiss mice inoculated with PbA is unknown.

**Aim:** Proving the effect of the combination of *A.muricata* and ACT towards the percentage of splenic lymphoblast infected by malaria.

**Method:** Pure laboratory experimental with Post Test Only Control Group Design. Samples which consist of 20 Swiss mice with certain criteria, were divided into 4 groups. K group were given water. P1 group were given *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/day for prevention and 6.24 mg/KgBB/day for treatment. P2 group were given ACT 0.546 mg/KgBB/day. P3 group were given *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/day for prevention and 6.24 mg/KgBB/day for treatment and ACT 0.546 mg/KgBB/day. On day 21, blood tail was taken to measure the percentage of parasitaemia and was terminated for splenocytes isolation to measure the percentage of splenic lymphoblast. Statistical tests used in the research are One – Way ANOVA test and Post-Hoc test for splenic lymphoblast and Kruskal Wallis test and Mann Whitney test for the percentage of parasitaemia.

**Result:** The Average percentage of splenic lymphoblast K group are (26.7%), P1 (17.38%), P2 (11.142%), P3 (7.546%). Significant differences are found in groups K – P1 ( $p=0.007$ ), K – P2 ( $p=0.000$ ), K – P3 ( $p=0.000$ ), P1 – P3 ( $p=0.005$ ). Groups P1 – P2 ( $p=0.056$ ) and P2 – P3 ( $p=0.253$ ) have no differences. There are significant differences of the percentage of parasitaemia among groups K – P2 ( $p=0.009$ ), K – P3 ( $p=0.009$ ), P1 – P2 ( $p=0.009$ ), P1 – P3 ( $p=0.009$ ). There are no differences of the percentage of parasitaemia between groups K – P1 ( $p=0.465$ ) and P2 – P3 ( $p=0.209$ ).

**Conclusion:** The effect of the combination of *A.muricata* and ACT on the percentage of splenic lymphoblast infected by malaria is meaningless.

**Keywords:** *A.muricata*, ACT, splenic lymphoblast, PbA.

## PENDAHULUAN

Kemenkes RI melaporkan angka kesakitan malaria tahun 2009 mencapai 1,85% per 1000 penduduk. Penyebab malaria yang tertinggi pada tahun 2009 adalah *P. vivax* (55,8%), kemudian *P. falciparum*.<sup>1</sup> Spesies parasit yang dominan menyebabkan malaria di Indonesia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*, yang diketahui dapat menimbulkan malaria berat salah satunya malaria serebral yang dapat menyebabkan kematian pada penderitanya.<sup>2</sup>

Skizon difagosit oleh sel makrofag dan limfosit pada limpa yang menyebabkan peradangan sel sehingga terjadi perbesaran limpa (*splenomegaly*).<sup>3,4</sup> Pembentukan limfoblas terjadi pada saat limfosit teraktivasi oleh rangsangan antigenic yang terjadi dalam organ limpa.<sup>5</sup> Hal tersebut akan mempengaruhi persentase limfoblas limpa pada penderita MS sehingga perlu adanya pengelolaan untuk terapi MS. Ekstrak *methanol* daun sirsak terbukti meningkatkan kadar CXCL12 produk sel limpa mencit *Swiss* fase MS.<sup>6</sup>

Kombinasi terapi diperlukan untuk melindungi obat anti malaria saat ini dan yang akan datang. *Artemisinin – naphthoquine* (AN) dan DHP sangat efektif dan aman untuk setiap malaria serta kedua obat ini menjanjikan untuk terapi baris pertama kebijakan di Indonesia.<sup>7</sup>

Terapi ACT (DHP)- *A.muricata* akan diuji efektivitasnya pada penelitian ini, sebelum diaplikasikan nantinya. Efektivitasnya dinilai dari persentase limfoblas limpa pada mencit *Swiss* yang diinokulasikan PbA. Semakin kecil persentase limfoblas limpa maka semakin efektif terapi kombinasi tersebut.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni yang didesain menggunakan desain *Post Test Only Control Group Design*. Objek yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit *Swiss* yang berjenis kelamin betina dengan berat mencit rata – rata 20 – 35 gram dan umur mencit adalah 8 minggu.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tanggal 26 April sampai dengan 16 Mei 2016. Sampel diambil dengan cara *simple random sampling*, besar sampel minimal tiap kelompok adalah 5 ekor mencit dengan cadangan 10% dan terdapat 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol sehingga jumlah sampel seluruhnya adalah 24 ekor mencit.

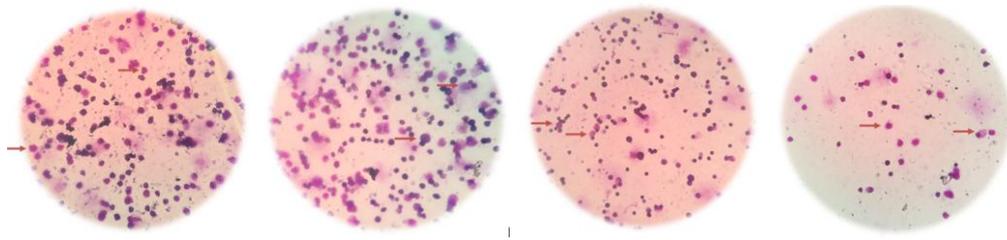
Mencit diadaptasikan selama 6 harikemudian diberikan perlakuan sesuai dengan ketentuan. Kelompok K diberi air. Kelompok P1 diberi *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/hari untuk pencegahan dan 6.24 mg/KgBB/hari untuk pengobatan. Kelompok P2 diberi ACT 0.546 mg/KgBB/hari. Kelompok P3 diberi *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/hari untuk pencegahan dan 6.24 mg/KgBB/hari untuk pengobatan dan ACT 0.546 mg/KgBB/hari. Hari ke-21 diambil darah ekor untuk mengukur parasitemia dan diterminasi untuk isolasi splenosit untuk mengukur persentase limfoblas limpa.

Uji statistik untuk pengolahan data menggunakan uji *Kolmogor Smirnov* untuk uji normalitas dengan  $p\ value > 0.01$  data berdistribusi normal. Uji *Lavene Statistic* untuk uji homogenitas dengan  $p\ value > 0.01$  data homogen. Uji One-Way ANOVA dan uji Post-Hoc untuk limfoblas limpa serta uji Kruskal Wallis dan uji Mann Whitney untuk persentase parasitemia dengan  $p\ value < 0.01$  ada perbedaan yang signifikan.

## HASIL

Penelitian telah dilakukan selama 21 hari di Laboratorium Parasitologi FK UNDIP. Terdapat 1 ekor mencit mati pada kelompok kontrol sehingga tersisa 23 ekor mencit dan

sudah memenuhi untuk minimal sampel. Hari ke-21 sebanyak 20 ekor mencit diambil darah ekor untuk mengukur parasitemia dan diterminasi untuk isolasi splenosit untuk mengukur persentase limfoblas limpa. Limfoblas limpa ditunjukkan oleh panah.



**Gambar 1. Limfoblas Limpa Masing – Masing Kelompok**

Gambar 1. Foto limfoblas limpa kelompok K, P1, P2, P3 (diurutkan dari sebelah kiri) dalam satu lapang pandang. Limfoblas limpa ditunjukkan oleh panah.

**Tabel 1. Analisis Deskriptif**

<b>Sampel</b>	<b>Rata-Rata</b>
Kontrol	26.70
P1	17.38
P2	11.14
P3	7.54

Tabel 1. Menunjukkan nilai rata – rata terendah terdapat pada kelompok perlakuan P3 yaitu 7.54%. Penurunan persentase limfoblas kelompok P1, P2, P3 terhadap rata-rata kelompok kontrol (K) yaitu 1.53x; 2.40x; 3.54x.

**Tabel 2. Uji normalitas Persentase Limfoblas Limpa (*Kolmogorov Smirnov*)**

<b>Kelompok</b>	<b><i>P value</i></b>
Kontrol	0.200
P1	0.200
P2	0.200
P3	0.200
Gabungan	0.107

Tabel 2. Menunjukkan semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol serta kelompok gabungan memiliki nilai yang signifikan dimana  $p\ value > 0.01$  sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

**Tabel 3.** Uji Homogenitas dan ANOVA Persentase Limfoblas Limpa

Uji	<i>P value</i>
<i>Lavene Statistic</i>	0.053
<i>One-Way ANOVA</i>	0.00006

Tabel 3. Menunjukkan uji *Lavene Statistic p value* > 0.01 maka data homogen. Uji *One- Way ANOVA p value* < 0.01 maka terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok tersebut.

**Tabel 4.** Uji *Post Hoc* Persentase Limfoblas Limpa

Kelompok	<i>P value</i>
K – P1	0.00729
K – P2	0.00010
K – P3	0.00001
P1 – P2	0.05643
P1 – P3	0.00511
P2 – P3	0.25315

Tabel 4. Menunjukkan persentase limfoblas mengalami penurunan yang bermakna terdapat antara kelompok K – P1, K – P2, K – P3, P1 – P3. Hasil tidak berbeda didapatkan antara P1 – P2 dan P2 – P3.

**Tabel 5.** Uji Normalitas Persentase Parasitemia (*Kolmogorov Smirnov*)

Kelompok	<i>P value</i>
K	0.200
P1	0.200
P2	0.200
P3	0.200
Gabungan	0.00001

Tabel 5 Menunjukkan masing – masing kelompok memiliki nilai *p value* > 0.01 data berdistribusi normal, namun ketika digabung nilai *p value* < 0.01 sehingga data tidak berdistribusi normal.

**Tabel 6.** Uji *Kruskal Wallis* persentase Parasitemia

Uji Statistik	<i>P value</i>
Uji <i>Kruskal Wallis</i>	0.002

Tabel 6. Menunjukkan bahwa nilai *p value* < 0.01 sehingga terdapat perbedaan bermakna pada setiap kelompok.

**Tabel 7.** Uji *Mann Whitney* Persentase Parasitemia

Kelompok	<i>P value</i>
K – P1	0.465
K – P2	0.009
K – P3	0.009
P1 – P2	0.009
P1 – P3	0.009
P2 – P3	0.209

Tabel 7. Menunjukkan persentase parasitemia mengalami penurunan secara bermakna antara kelompok K – P2, K – P3, P1 – P2, P1 – P3. Hasil tidak berbeda terlihat antara kelompok K – P1 dan P2 – P3.

## PEMBAHASAN

Kondisi yang diberikan pada penelitian ini adalah kondisi infeksi dimana infeksinya adalah *Plasmodium*. Limpa merupakan salah satu organ yang paling aktif dalam memberikan respon imun selama infeksi malaria sampai akhirnya terjadi pembesaran limpa di dalamnya. Pulpa merah berguna untuk pembentukan eritrosit dan pulpa putih berguna untuk pembentukan sel – sel kekebalan tubuh. Jika keduanya mungkin membesar maka terjadi proliferasi sel – sel yang sangat aktif sehingga limfoblas yang terbentuk pun lebih tinggi lagi seperti yang ditunjukkan pada kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol parasitemia tidak terkendali karena ada dua kemungkinan yaitu imunosupresi mulai bekerja atau imunitas tidak terkendali sama sekali.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *A. muricata* dapat menurunkan persentase limfoblas secara bermakna. Hal itu menunjukkan bahwa *A. muricata* mampu untuk memodulasi respon imun selama terjadinya infeksi khususnya pada fase malaria serebral. Sehingga terbukti bahwa *A. muricata* mempunyai efek sebagai imunodulator. Namun

*A.muricata* belum terlalu bermakna dalam menurunkan persentase parasitemia. Hal ini mungkin dikarenakan dosis *A.muricata* yang digunakan untuk penelitian ini kurang besar sebagai terapi tunggal dalam pengobatan malaria serebral sehingga perlu penelitian lebih lanjut untuk dosis yang lebih variatif lagi dalam menanggulangi masalah malaria serebral. Walaupun parasitemia sama dan respon infeksi sama *A.muricata* memiliki persentase limfoblas limpa lebih rendah, sehingga perlu dipastikan apakah limfoblas pada limpa mempengaruhi survivalnya.

Antara *A.muricata* dengan ACT ternyata didapatkan limfoblas tidak berbeda bermakna. Sementara itu parasitemia yang didapat pada kelompok yang diberi ACT ternyata lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok yang diberi *A.muricata* saja. Hal ini menunjukkan bahwa pada tingkat parasitemia yang berbeda dapat memicu respon imun yang sama, keterbatasannya yaitu apakah ini protektif untuk host yang menerima *A.muricata* saja. Sehingga perlu diteliti seperti yang telah disebut sebelumnya, diantaranya adalah survival. Limfoblas yang ditemukan pada kelompok yang diberi ACT kemungkinan menyesuaikan fase penyembuhan. Sementara pada kelompok yang diberi *A.muricata* masih dalam proses menanggulangi infeksi karena parasitemia masih tinggi.

Ternyata setelah diberikan kombinasi ACT dan *A.muricata* tidak ada perbedaan pada tingkat parasitemia maupun limfoblas. Ini menunjukkan bahwa *A.muricata* memang masih perlu pemberian ACT sebagai terapi standar. Apakah ada efek menguntungkan secara respon imun harus ditelaah pada dua kelompok ini (ACT saja dengan ACT dan *A.muricata*). Kombinasi mempunyai dampak yang baik atau tidak misalnya pada waktu terjadi re-infeksi termasuk apakah terjadi kemungkinan kerusakan jaringan misalnya karena kombinasi *A.muricata* dan ACT memiliki dampak imunodulator.

Penelitian terdahulu adanya peningkatan kemokin maupun sitokin anti inflamasi yaitu CXCL-12 dan IL-10 yang lebih tinggi pada kelompok yang diberi ekstrak metanol *A.muricata* saja. Gamma interferon dan IL-12 pada kelompok yang diberi maupun tidak diberi *A.muricata* tetap sama yang naik adalah anti inflamasinya.<sup>6</sup>

Sementara *A.muricata* dari penelitian terdahulu tidak memodulasi respon imun. Kemungkinan bahwa Th1 tidak dimodulasi oleh *A.muricata* tetapi *A.muricata* lebih memodulasi pada Th2 karena IL-10 lebih mendukung Th2. Dari sini terlihat bahwa kemungkinan ekstrak methanol *A.muricata* masih berefek secara protektif dengan

meningkatkan respon imun Th2 selama malaria serebral dan ini perlu ditindak lanjuti pada ekstrak air.

## **SIMPULAN DAN SARAN**

### **Simpulan**

Persentase limfoblas lebih rendah kelompok yang diberi ekstrak air daun *A. muricata* dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan pre dan pasca inokulasi PbA. Persentase limfoblas pada kelompok yang diberi ekstrak air daun *A. muricata* dan obat ACT tidak lebih rendah dibanding kelompok yang diberi obat ACT saja pasca inokulasi PbA. Persentase limfoblas lebih rendah kelompok yang diberi ekstrak air daun *A. muricata* dan obat ACT dibanding kelompok yang diberi ekstrak air daun *A. muricata* pre dan pasca inokulasi PbA.

### **Saran**

Saran yang dapat diberikan yaitu penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui bahan aktif yang terkandung dalam *A. muricata* sebagai terapi *adjuvant* yang berperan pada mekanisme antimalaria. Penelitian lebih lanjut mengenai survival *A. muricata* sebagai *adjuvant* dalam pengobatan malaria serebral masih diperlukan. Penelitian lebih lanjut mengenai respon imun terkait dengan aktivasi sel Th2 pada malaria serebral yang diberi kombinasi ACT dengan *A. muricata*.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Dr. dr. RA. Kisdjamiatun RMD, M.Sc., Prof. dr. Edi Dharmana, M.Sc., Sp.ParK., Ph.D., dr. Rr. Mahayu Dewi Ariani, M.Si.Med., dr. Ariosta yang telah membantu peneliti dalam menyusun artikel Karya Tulis Ilmiah ini. Terima kasih peneliti ucapkan kepada Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Laboratorium Cebior serta pihak lain yang telah membantu dalam terselesaikannya artikel Karya Tulis Ilmiah ini.

---

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Kemenkes RI. Epidemiologi Malaria di Indonesia. Triwulan I. Jakarta : Kemenkes RI. 2011.
2. Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar 2013. Jakarta: Kemenkes RI. 2013.
3. Gartner, Leslie P. dan Hiatt, James L. Buku Ajar Berwarna Histologi. Singapura: Elsevier. 2007.
4. Harijanto, P.N. Malaria dari Molekuler ke Klinis Edisi 2. Jakarta: EGC. 2009.
5. Dorland, W.A. Newman. Kamus Kedokteran Dorland. Edisi 31 Jakarta: EGC. 2010.
6. Kisdjamiatun; Sudaryanto; Wijayahadi, Noor. Efek Daun *Annona muricata* Linn terhadap Kadar Angiopoietin-2 dan CXCL12 Darah serta Korelasi Kadar CXCL12 dan IFN- $\gamma$  Limpa. Semarang: FK Universitas Diponegoro. 2015.
7. Tjitra, Emiliana; Hasugian, Armedy R.; Siswantoro, Hadjar; Prasetyorini, Budi; Ekowatiningsih, Riyanti; Yusnita, Endah A; Purnamasari, Telly; Driyah, Srilaning; Salwati, Ervi; Nurhayati; Yuwarni, Eni; Januar, Lidwina; Labora, Joseph; Wijayanto, Bambang; Amansyah, Fajar; Dedang, Tersila AD; Purnama, Asep; Trihono. Efficacy and Safety of Artemisinin-Naphthoquine *versus* Dihydroartemisinin-Piperaquine in Adult Patients with Uncomplicated Malaria: a Multi-Centre Study in Indonesia. *Malaria Journal*. 2012;11(1):1-14. Available from <http://www.malariajournal.com/content/11/1/153>.