

## **PENGARUH *ANNONA MURICATA* TERHADAP SEBUKAN LEUKOSIT OTAK MENCIT MALARIA YANG DITERAPI *ARTEMISININ-BASED COMBINATION THERAPY* (ACT) (STUDI INFEKSI *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA PADA MENCIT SWISS)**

Hani Nur Rahmawati Purwanto<sup>1</sup>, Kisdjamiatun<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Staf Pengajar Ilmu Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro  
JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

### **ABSTRAK**

**Latar Belakang:** Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia. Beberapa wacana penggunaan terapi adjuvant sebagai pendamping obat anti malaria standard (ACT) diperlukan untuk memperbaiki disfungsi vaskuler pada malaria. Bukti bahwa ekstrak daun *A.muricata* dapat menurunkan sebulan sel leukosit otak mencit *swiss* yang diinokulasi PbA belum ada dan perlu diteliti.

**Tujuan:** Membuktikan pengaruh pemberian *Annona Muricata* terhadap sebulan leukosit otak mencit malaria yang diterapi *Artemisinin Based Combination therapy*

**Metode:** Penelitian ini adalah penelitian *Experimental* dengan desain *Post Test Only Control Group Design*. Sampel terdiri dari 20 ekor mencit *swiss* yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok K diberi air. Kelompok P1 diberi *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/hari sebagai dosis pencegahan dan 6.24 mg/KgBB/hari sebagai dosis pengobatan. Kelompok P2 diberi ACT 0.546 mg/KgBB/hari. Kelompok P3 diberi *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/hari sebagai dosis pencegahan dan 6.24 mg/KgBB/hari sebagai dosis pengobatan dan ACT 0.546 mg/KgBB/hari. Perlakuan selama 14 hari diakhiri dengan terminasi mencit dan isolasi organ otak untuk sediaan histopatologi dan koleksi darah untuk pengamatan tingkat parasitemia. Uji statistik menggunakan uji *Chi-square* untuk leukosit otak serta menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann Whitney* untuk persentase parasitemia.

**Hasil:** Uji *Chi-square* limfosit otak didapatkan hasil tidak bermakna  $p>0,05$  dan syarat uji *Chi-square* tidak terpenuhi. Penggabungan dilakukan pada kelompok 1 dan 2 kemudian diuji kembali menggunakan *Chi-square* didapatkan hasil tidak bermakna  $p>0,05$  namun syarat uji *Chi-square* terpenuhi. Parasitemia didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok K-P2 ( $p=0,008$ ), K-P3 ( $p=0,009$ ), P1-P2 ( $p=0,008$ ), P1-P3 ( $p=0,009$ ) maupun P2-P3 ( $p=0,011$ ). Tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok K-P1 ( $p=0,249$ ).

**Simpulan:** Pengaruh pemberian *A.muricata* maupun *A.muricata* dengan ACT terhadap leukosit otak mencit *swiss* yang diinfeksi PbA didapatkan tidak bermakna.

**Kata kunci:** *Annona muricata*, ACT, Leukosit Otak, Limfosit, PbA, Malaria.

### **ABSTRACT**

**THE EFFECT OF *ANNONA MURICATA* TOWARD BRAIN LEUKOCYTE INFILTRATION OF SWISS MICE THAT TREATED BY *ARTEMISININ-BASED COMBINATION THERAPY* (ACT) (STUDY OF *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA INFECTION IN SWISS MICE)**

**Background:** Malaria remains a public health problem in Indonesia. There are some discourse of using adjuvant therapy as a companion to the standard anti-malarial drug (ACT) is needed to repair vascular disfunction. Evidence shows that *A.muricata* leaf extract can

lower brain leukocyte infiltration of swiss mice inoculated PbA is not yet exist and need to be investigated.

**Objective:** To Prove the effect of *Annona muricata* toward brain leukocyte infiltration of malaria mice that treated with Artemisinin Based Combination Therapy

**Methods:** This study was an experimental study with Post Test Only Control Group design. There are 20 swiss mice that divided into 4 groups. K group were given water. P1 group were given *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/day for prevention dose and 6.24 mg/KgBB/day for treatment dose. P2 group were given ACT 0.546 mg/KgBB/day. P3 group were given *A.muricata* 3.12 mg/KgBB/day for prevention dose and 6.24 mg/KgBB/day for treatment dose and ACT 0.546 mg/KgBB/day. Treatment for 14 days ending with the termination of the mice brain and organ isolation for histopathologic preparation and collection of blood for observation level parasitemia. Statistical tests used in the research are Chi-square for leukocyte brain, Kruskal-Wallis and Mann Whitney test for parasitemia.

**Result:** Chi-square test of brain lymphocyte showed no significant differences with  $p > 0,05$  and the requirement was not fulfilled. Merger of table 1 and table 2 is done then tested again using Chi-square and the result show no significant differences with  $p > 0,05$  but the requirement is fulfilled. Parasitemia obtained significant differences between groups K-P2 ( $p=0,008$ ), K-P3 ( $p=0,009$ ), P1-P2 ( $p=0,008$ ), P1-P3 ( $p=0,009$ ) and P2-P3 ( $p=0,011$ ). There is no significant differences between groups K-P1 ( $p=0,249$ ).

**Conclusion:** The effect of *A.muricata* or the combination of *A.muricata* with ACT toward brain leukocyte infiltration of swiss mice infected with PbA is meaningless.

**Keywords:** *Annona muricata*, ACT, Brain Leukocyte, Lymphocyte, PbA, Malaria.

## PENDAHULUAN

Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia termasuk Indonesia.<sup>1</sup> Kasus malaria berat utamanya ditimbulkan oleh *Plasmodium falciparum*. Serebral malaria merupakan salah satu komplikasi berat *Plasmodium falciparum*.<sup>2,3</sup> Beberapa wacana penggunaan terapi adjuvant sebagai pendamping obat anti malaria standard diperlukan untuk memperbaiki disfungsi vaskuler pada serebral malaria.<sup>4</sup> Herbal yang bersifat immunomodulator sudah ada yang diteliti pada EMS (experimental malaria serebral) yaitu *A.muricata*. *A.muricata* mengandung acetogenin yang bersifat antimalaria.<sup>5</sup>

Kandungan lain dari daun *A.muricata* (Sirsak) mempunyai efek immunomodulator pada EMS. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak metanol daun sirsak bermakna meningkatkan Kadar IL-10 dan Kadar CXCL12 yang merupakan kemokin anti-inflamasi.<sup>6,7</sup> Mencit EMS juga menunjukkan adanya peningkatan sebulan sel – sel leukosit di pembuluh kapiler otak yang mempunyai efek patologis.<sup>8</sup> Bukti bahwa ekstrak daun *A.muricata* bisa menurunkan sebulan sel leukosit belum ada dan perlu diteliti.

Daun sirsak ekstrak metanol yang digunakan terbukti bersifat toksik, sementara ekstrak air dari daun sirsak tidak toksik bahkan mengandung kadar fenol yang lebih tinggi.<sup>9</sup> Usul Penelitian yang akan dilaksanakan ini bertujuan untuk membuktikan apakah ekstrak air daun sirsak dapat menurunkan sebaran leukosit di kapiler otak. Daun *A.muricata* dapat menurunkan tingkat parasitemia pada hari ke 3 tetapi tidak pada hari ke 5 dan 7 pasca inokulasi PbA. Peningkatan mencolok tingkat parasitemia terjadi pada hari ke 5 dan mencapai puncaknya pada hari ke 7 pada mencit swiss yang diberi perlakuan daun *A.muricata* maupun kelompok tanpa perlakuan tersebut.<sup>10</sup> Hal ini menjadi pertimbangan bahwa pemberian obat anti malaria standar perlu diberikan sebelum terjadi peningkatan tajam pada hari kelima. Penelitian ini disamping mengamati perlakuan daun *A.muricata* juga mengamati efek protektif pada kelompok yang diberi perlakuan yang sama ditambah terapi anti malaria pada hari ke 4 pasca inokulasi PbA.

WHO merekomendasikan penggunaan *Artemisinin- based Combination Therapy* sebagai lini pertama obat terapi kombinasi untuk menangani malaria.<sup>11</sup> Dihydroartemisinin – Piperaquine (DHP) merupakan salah satu jenis ACT yang paling banyak digunakan di Indonesia.<sup>12</sup> DHP terbukti lebih efektif, aman, murah serta lebih mampu dalam melawan resistensi Plasmodium falciparum dibandingkan dengan jenis yang lain.<sup>13</sup>

## **METODE**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian true experimental dengan rancangan *post test only control group design*. Kriteria inklusi penelitian ini adalah Mencit *swiss* betina usia 8 minggu dengan berat badan 20 – 25 gram dalam keadaan sehat, anatomi yang tampak normal, dengan aktivitas dan tingkah laku normal.

Pengambilan sampel dilakukan secara simple random sampling. Pengelompokan dilakukan secara acak setelah 7 hari mencit diadaptasi di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan masing masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. 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.

Pada hari ke-22 mencit diambil darah dari ekor untuk persentase parasitemia kemudian dilakukan terminasi serta pembedahan dan pengambilan otak untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian terapi *Artemisinin based combination therapy* dan ekstrak *Annona muricata*. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah sebukan leukosit otak.

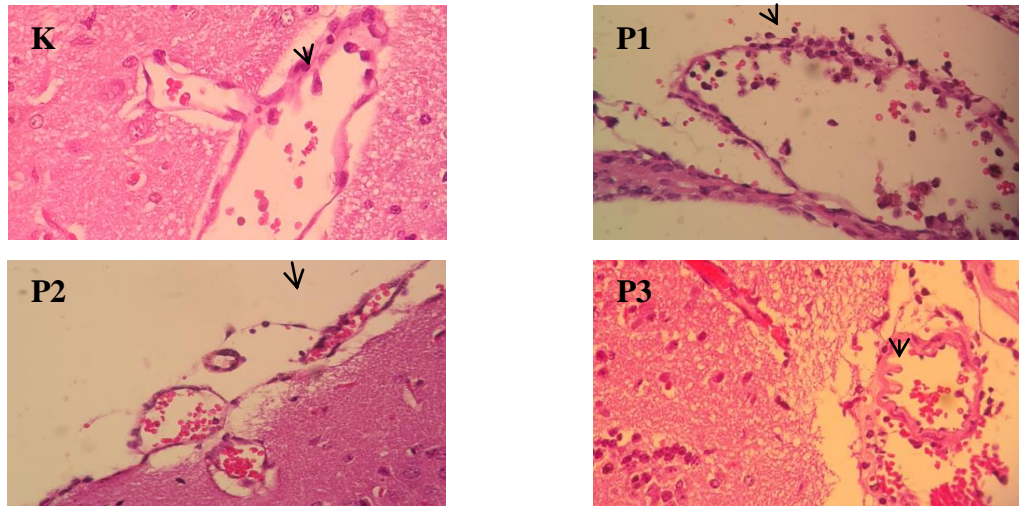
Data pada penelitian ini bersifat primer. Data berupa gambaran histopatologis sebukan leukosit otak pada mencit Swiss. Pengamatan dan pemberian skor dilakukan pada lima lapangan pandang setiap preparat. Untuk menilai sebukan leukosit otak menggunakan kriteria sebagai berikut :

- Score 1 = 1 - 3 limfosit perivascular
- Score 2 = 4 - 6 limfosit
- Score 3 = >6 limfosit

Analisis data sebukan leukosit otak deskriptif menampilkan nilai median (minimal – maksimal). Uji *Chi-Square* digunakan karena semua variabel bebas dan variabel terikat berskala kategorik (nominal dan ordinal). Jika syarat uji *Chi-Square* tidak terpenuhi maka dilakukan penggabungan dan uji *Chi-Square* dilakukan kembali. Data persentase parasitemia diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji analisis beda *One Way Anova* dilakukan pada data normal untuk melihat perbedaan kemaknaan secara keseluruhan dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk melihat perbedaan pada tiap kelompok perlakuan. Uji non parametrik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* dilakukan pada data tidak normal.

## HASIL

Pengamatan dan pembacaan gambaran histopatologi sebukan leukosit otak menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Sel limfosit otak ditunjukkan oleh anak panah.



**Gambar 1.** Limfosit Otak

Keterangan : (K) Kelompok Kontrol; (P1) Kelompok perlakuan 1; (P2) Kelompok perlakuan 2; (P3) Kelompok perlakuan 3

Pengambilan sampel berupa darah mencit pada ekor dilakukan sebelum terminasi untuk mengetahui kadar parasitemia mencit. Parasitemia hari ke 3 pasca inokulasi menunjukkan bahwa semua mencit penelitian terinfeksi PbA. Parasitemia juga diperiksa pada hari ke 5 dan ke 7.

**Tabel 1. Analisis Deskripsi Limfosit Perivascular di Otak**

Kelompok	N	Rerata	Std. Deviasi	Median	Minimum	Maksimum
K	25	0,60	0,500	1,00	0,0	1
P1	25	0,76	0,523	1,00	0,0	2
P2	25	0,72	0,458	1,00	0,0	1
P3	25	0,60	0,577	1,00	0,0	2

Tabel 1 menunjukkan kelompok K dan kelompok P3 mempunyai nilai rata – rata terendah yang sama yaitu 0,60 dibandingkan semua kelompok. Nilai rata rata tertinggi terdapat pada kelompok P1. Tidak ada perbedaan median yaitu 1,00 pada setiap kelompok.

**Tabel 2. Uji *Chi-square* Limfosit Perivascular di Otak**

Kelompok	Limfosit Perivascular Otak			Total
	0	1	2	
K	10 (28,6%)	15 (23,8%)	0 (0,0%)	25 (25,0%)
P1	7 (20,0%)	17 (27,0%)	1(50,0%)	25 (25,0%)
P2	7 (20,0%)	18 (28,6%)	0 (0,0%)	25 (25,0%)
P3	11 (31,4%)	13 (20,6%)	1(50,0%)	25 (25,0%)

Tabel 2 menunjukkan menunjukkan hasil *pearson Chi-square* 0,624 sehingga didapatkan hasil tidak signifikan. Syarat *uji Chi-Square* tidak terpenuhi yaitu terdapat 4 sel (33,3%) kurang dari lima sehingga dilakukan penggabungan pada expected count terendah yaitu kelompok 1 dan 2 setelah itu dilakukan kembali uji *chi square*.

**Tabel 3. Uji *Chi-square* Limfosit Perivascular di Otak**

Kelompok	Limfosit Perivascular Otak		Total
	0	1&2	
K	10 (28,6%)	15 (23,1%)	25 (25,0%)
P1	7 (20,0%)	18 (27,7%)	25 (25,0%)
P2	7 (20,0%)	18 (27,7%)	25 (25,0%)
P3	11 (31,4%)	14 (21,5%)	25 (25,0%)

Tabel 3 tidak didapatkan sel kurang dari lima sehingga syarat uji *chi square* terpenuhi. Hasil *Pearson Chi-Square* 0,524 sehingga didapatkan hasil tidak signifikan.

**Tabel 4. Uji normalitas Persentase Parasitemia hari ke-7**

Kelompok	<i>P value</i>
K	0,837
P1	0,257
P2	0,000
P3	0,814

Tabel 4 menunjukkan kelompok K, P1 dan P3 memiliki  $p > 0,05$  sedangkan P2 memiliki  $p < 0,05$  yaitu 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal.

**Tabel 5. Uji *Kruskal-Wallis* Persentase Parasitemia hari ke-7**

Kelompok	N	Mean Rank	P
K	5	16,60	0,001
P1	5	14,40	
P2	5	7,90	
P3	5	3,10	

Hasil uji *Kruskal-Wallis* pada tabel 5 didapatkan *p value* yaitu 0,001

**Tabel 6. Uji *Mann Whitney* Persentase Parasitemia hari ke-7**

Grup	K	P1	P2	P3
K		(p=0,249)	(p=0,008)	(p=0,009)
P1			(p=0,008)	(p=0,009)
P2				(p=0,011)
P3				

Perbedaan bermakna didapatkan antara kelompok K-P2 ( $p = 0,008$ ) maupun K-P3 ( $p = 0,009$ ) serta P1-P2 ( $p = 0,008$ ) maupun P1-P3 ( $p = 0,009$ ) dan P2-P3 ( $p = 0,011$ ).

**PEMBAHASAN**

Organ Otak mempunyai peran penting dalam proses terjadinya Serebral Malaria. Hal ini berkaitan dengan proses inflamasi dimana terjadi peningkatan dari ekspresi molekul adhesi sehingga eritrosit yang mengandung parasit (EP), leukosit aktif dan platelet bersekuestrasi pada endotelium yang inflamasi.<sup>14</sup> Sekuestrasi eritrosit yang mengandung parasit (EP) dan malaria serebral berkaitan dengan produksi TNF yang berlebihan yang mempengaruhi ekspresi dari ICAM-1.<sup>15</sup> Produksi berbagai sitokin pro inflamasi oleh aktivasi sel Th1 dan kurangnya produksi sitokin anti inflamasi oleh Th2 berhubungan dengan terjadinya malaria serebral.<sup>8,16</sup>

*A. muricata* atau yang dikenal dengan nama sirsak di Indonesia memiliki beberapa kandungan penting seperti *flavonoid* dan *acetogenin annonaceous*. Berdasarkan penelitian sebelumnya ekstrak etanol *A.muricata* efektif menekan sitokin pro - inflamasi seperti TNF -  $\alpha$  dan IL - 1  $\beta$ .<sup>5</sup>

Hasil penelitian menunjukkan pengaruh *A.muricata* terhadap sebulan leukosit otak tidak dijumpai penurunan limfosit. Hasil uji *chi square* yaitu Pearson chi square ( $p = 0,624$ )

sehingga tidak terdapat perbedaan bermakna. Pemeriksaan Histopatologis, menunjukkan jumlah limfosit pada sel otak tiap kelompok tidak berbeda bermakna. Limfosit yang dihitung adalah di sekitar pembuluh darah. Hal ini berhubungan dengan proses patologis serebral malaria yaitu obstruksi mikrovaskuler karena sekuestrasi leukosit dan eritrosit berparasit di otak.<sup>17</sup>

Perbedaan bermakna tidak ditemukan pada *score* limfosit perivascular dari keempat kelompok pada penelitian ini. Penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan mencit C57BL/6. Mencit C57BL/6 menunjukkan peningkatan jumlah limfosit perivascular pada hari ke 7 (fase serebral malaria).<sup>18</sup> Perbedaan strain mencit kemungkinan merupakan salah satu penyebab terjadinya perbedaan hasil temuan.

Sel Endotel vascular di otak mengalami peningkatan produksi CXCL9 dan CXCL10 selama infeksi *plasmodium berghei anka* (PbA). Hal ini mengakibatkan sel Th1 yang memiliki CXCR3 menuju ke perivascular otak selanjutnya menghasilkan IFN- $\gamma$  yang lebih memperkuat peningkatan produksi CXCL 9 dan CXCL10. Sel T CD8+ mengekspresi CXCR3 yang merupakan reseptor CXCL10 akan menuju ke otak dan berhubungan dengan terjadinya serebral malaria.<sup>19</sup>

Berdasarkan penelitian sebelumnya ditemukan ekspresi CXCL10 astrosit lebih rendah pada mencit *swiss* yang diinfeksi PbA dibandingkan kelompok sehat baik yang menerima perlakuan AME maupun yang tidak.<sup>20</sup> Apoptosis astrosit ditemukan pada C57BL/6 mencit yang diinfeksi PbA. Hal ini berpengaruh terhadap penurunan ekspresi CXCL10 astrosit.<sup>21</sup> Astrosit berperan menjaga homeostasis di otak termasuk menghambat inflamasi di otak.<sup>22</sup> Perlakuan dengan imunomodulator, Flt3, menunjukkan adanya penurunan parasitemi dan tercegahnya mencit C57BL/6 dari EMS.<sup>23</sup> Mencit tersebut menunjukkan peningkatan jumlah sel T CD8+, walaupun demikian sel T CD8+ pada mencit tersebut menurun kemampuannya untuk memproduksi IFN- $\gamma$  dan granzim B. Penelitian perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa terjadi penurunan ekspresi IFN- $\gamma$  dan granzim B pada limfosit perivaskuler di otak mencit fase malaria serebral ditemukan pada mencit yang diberi AME.

Parasitemia kelompok kontrol lebih tinggi daripada kelompok P2 ( $p = 0,008$ ) maupun P3 ( $p = 0,009$ ), tetapi parasitemia kelompok kontrol tidak berbeda bermakna dengan kelompok P1 ( $p = 0,249$ ). Temuan tersebut menunjukkan bahwa pemberian ACT maupun kombinasi ACT AME berpengaruh menurunkan parasitemia. Parasitemia kelompok



kombinasi ACT dan AME ternyata lebih rendah dibandingkan ACT saja. Penelitian ini merupakan yang pertama membuktikan bahwa ekstrak air AME jika dikombinasikan dengan ACT lebih baik pengaruhnya dalam menurunkan parasitemia dibandingkan dengan pemberian ACT saja. Parasitemia P1 (AME saja) tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Temuan ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan perlakuan ekstrak etanol AME, yang menunjukkan tidak adanya perbedaan parasitemia pada kelompok yang menggunakan AME saja dibanding kelompok kontrol pada mencit *swiss* fase malaria serebral.<sup>24,25</sup>

## **SIMPULAN DAN SARAN**

### **Simpulan**

Sebaran leukosit di otak mencit *swiss* yang diinokulasi PbA tidak ditemukan perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan.

### **Saran**

Saran pada penelitian ini yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan adanya hubungan perlakuan AME ekstrak air dengan normalnya ekspresi CXCL10 astrosit, penurunan jumlah astrosit yang apoptosis dan penurunan ekspresi IFN- $\gamma$  dan granzim B sel T CD8+ perivaskular otak mencit *Swiss* fase MS.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. WHO. WHO: World Malaria Report. Geneva: World Health Organization. 2011.
2. Kheliouen N, Viwami F, Lalya F, Tuikue-Ndam N, Moukoko ECE, Rogier C, et al. Plasmodium falciparum parasites causing cerebral malaria share variant surface antigens, but are they specific? Malar J. 2010;9:220.
3. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. Crit Care. 2003;7(4):315–23.
4. Carvalho LJDM, Moreira ADS, Daniel-Ribeiro CT, Martins YC. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;00(5):00–00.
5. Moghadamtousi S, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali H, Kadir H. Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. Int J Mol Sci. 2015;16(7):15625–58.
6. Asnawi A. Efektifitas Ekstrak Daun Sirsak terhadap Peningkatan Kadar IL-10 dan Hemoglobin. Fakultas Kedokteran Undip Semarang; 2015.

7. Djamiatun K, Sudaryanto, Wijayahadi N. Efek Daun *Annona muricata* Linn terhadap Kadar Angiopoietin-2 dan CXCL12 Darah serta Korelasi Kadar CXCL12 dan IFN- $\gamma$  Limpa. 2015;(Laporan penelitian Riset pengembangan dan penerapan FK Undip).
8. Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4(July):100.
9. de Sousa OV, Vieira GD-V, de Jesus R G de Pinho J, Yamamoto CH, Alves MS. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. *Int J Mol Sci.* 2010;11(5):2067–78.
10. Hardimarta FP. Efektivitas Daun Sirsak terhadap Derajat Parasitemia *Plasmodium Berghei*. *Media Farmasi Indonesia* Vol. 9 No. 2. 2014;
11. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition. 2015.
12. Kementerian Kesehatan RI. Epidemiologi Malaria di Indonesia. Jakarta; 2011.
13. Tjitra E, Hasugian AR, Siswanto H, Prasetyorini B, Ekowatiningsih R, Yusnita EA, et al. Efficacy and safety of artemisinin-naphthoquine versus dihydroartemisinin-piperaquine in adult patients with uncomplicated malaria: a multi-centre study in Indonesia. *Malar J.* 2012;11(1):153.
14. Ramos TN, Bullard DC, Darley MM, McDonald K, Crawford DF, Barnum SR. Experimental cerebral malaria develops independently of endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 (icam-1). *J Biol Chem.* 2013;288(16):10962–6.
15. Jambou R, Combes V, Jambou MJ, Weksler BB, Couraud PO, Grau GE. *Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):1–13.
16. Harijanto P., Nugroho A, Gunawan CA. Malaria dari Molekul ke klinis. 2nd ed. Jakarta: EGC; 2012.
17. Pai S, Qin J, Cavanagh L, Mitchell A, El-Assaad F, Jain R, et al. Real-Time Imaging Reveals the Dynamics of Leukocyte Behaviour during Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004236.
18. Shaw TN, Stewart-hutchinson PJ, Strangward P, Dandamudi B, Coles JA, Villegas-mendez A, et al. Perivascular Arrest of CD8 + T Cells Is a Signature of Experimental Cerebral Malaria. 2015;1–33.
19. Cells T, Harrington LE, Buchser W, Lemmon V, Jope RS. Astrocytes Modulate the Polarization of CD4 + T Cells to. 2014;9(1):1–10.
20. Sumia M. Ali Matug, Awal Prasetyo RK. The Effect of *Annona Muricata* to Reduce CXCL10 in the Brain Study in Cerebral Malaria of Swiss Mice. Semarang: Biomedical Science, Diponegoro University;
21. L W, JA K, M P. Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. 2006;
22. Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human Astrocytes : Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. 2014;9(4).

23. Tamura T, Kimura K, Yuda M, Yui K. Prevention of Experimental Cerebral Malaria by Flt3 Ligand during Infection with Plasmodium berghei ANKA □ †. 2011;79(10):3947–56.
24. Hadimarta FP. Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata*) dalam Meningkatkan Kadar IFN-□ dan Menurunkan Indeks Parasitemia (Uji Coba pada Mencit Swiss yang Diinokulasi Plasmodium Berghei Anka). Universitas Diponegoro; 2014.
25. Albakoush HM. The Effect of *Annona Muricata* to Reduce Parasitemia, Increase Phagocytosis Index and Nitric Oxide Production (Study in Cerebral Malaria Phase of Swiss Mice). Universitas Diponegoro; 2015.