

**PENGARUH PAPARAN ARTEMISININ BERULANG TERHADAP GAMBARAN
HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT (*Mus musculus*) YANG
DIINFEKSI *Plasmodium berghei*
THE EFFECT OF REPEATED ARTEMISININ EXPOSURE ON
HISTOPATHOLOGICAL VIEW OF MICE (*Mus musculus*) LIVER WITH
THE INFECTION BY *Plasmodium berghei***

Rini Tri Andayani¹⁾, Mas'ud Hariadi²⁾, Lilik Maslachah²⁾

¹⁾Mahasiswa, ²⁾Dosen

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C UNAIR, Jl. Mulyorejo-Surabaya 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : jbmvnunair@gmail.com

ABSTRACT

Malaria is one of the world's health problems, artemisinin is a choice to treat it. Artemisinin is used because it has an excellent safety profile, the effect of artemisinin has faster working and has a complex mechanism of action. This study was conducted to determine the effect of repeated artemisinin exposure on histopathological view of mice (*Mus musculus*) liver with the infection by *Plasmodium berghei*. A total of 48 male mice used in this study were divided into control group, treatment group and donors. In the control group were only infected with *Plasmodium berghei* at 1×10^5 in 0.2 ml of blood without the artemisinin drug exposure, in the treatment group were infected with *Plasmodium berghei* at 1×10^5 in 0.2 ml of blood and repeatedly exposed with artemisinin drug. The parameters observed in this experiment is portal inflammation, degeneration and necrosis of the liver of mice. The data was presented in table form microscopic scores and histopathology assessment of the degree of liver cells, were analyzed with the Kruskal-Wallis test than followed by Z test for multiple comparisons. Statistical data indicate that there are significant differences in portal inflammation, but there is no real difference to the degeneration and necrosis.

Key words : artemisinin, histopathology, liver, *Plasmodium berghei*

ABSTRAK

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan dunia, artemisinin adalah salah satu pilihan untuk mengatasinya. Artemisinin digunakan karena ditetapkan sebagai antimalaria dengan profil keamanan yang sangat baik, artemisinin memiliki efek kerja yang cepat dan mempunyai mekanisme kerja yang kompleks. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh paparan artemisinin berulang terhadap gambaran histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Sebanyak 48 ekor mencit jantan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi kelompok kontrol, kelompok perlakuan dan donor. Pada kelompok kontrol hanya diinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 0,2 ml darah yang mengandung parasit sebesar 1×10^5 tanpa diberi obat artemisinin, pada kelompok perlakuan yang diinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 0,2 ml darah yang mengandung parasit sebesar 1×10^5 dan diberi obat artemisinin berulang. Parameter yang diamati dalam percobaan ini adalah portal inflamasi, degenerasi dan nekrosis hepar mencit. Data hasil penelitian disajikan dalam tabel berupa skor penilaian derajat mikroskopis dan histopatologi sel hepar, dianalisis dengan uji *Kruskall-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji Z untuk perbandingan berganda. Dari hasil data statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada portal inflamasi, tetapi tidak terdapat perbedaan yang nyata pada degenerasi dan nekrosis.

Kata kunci : artemisinin, histopatologi, hepar, *Plasmodium berghei*

Pendahuluan

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang disebabkan oleh protozoa darah dari genus *Plasmodium*, yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* dengan gejala berupa demam yang sering/periodik, anemia, pembesaran limpa dan gejala lain karena pengaruhnya pada beberapa organ, misalnya otak, ginjal dan hepar (Husin, 2007).

Plasmodium berghei adalah protozoa darah yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia. Siklus hidup *Plasmodium berghei* dalam darah dimulai dari masuknya sporozoit infeksi ke dalam tubuh host. Sporozoit yang infeksi tidak langsung masuk ke dalam eritrosit, tetapi berkembang di luar eritrosit (bentuk eksoeritrositik), yaitu di dalam sel endotel hepar berkembang secara skizogoni membentuk skizon. Skizon yang pecah akan membebaskan merozoit yang akan masuk ke peredaran darah dan menginfeksi sel-sel darah baru, bersamaan dengan pecahnya sel induk semang (Suwanti dkk, 2012).

Hepar merupakan organ target dalam siklus hidup parasit malaria. Perubahan hepar secara histopatologi akibat infeksi malaria berat biasanya ditandai dengan adanya perbanyakan sel *Kupffer*, inflamasi sel radang, degenerasi sel hepatosit, nekrosis sel, kongesti pada sinusoid dan deposisi pigmen haemozoin. Pemahaman terhadap perkembangan parasit malaria pada hepar dapat memberikan harapan untuk menemukan strategi baru dalam melawan parasit malaria (Aidoo *et al.*, 2012).

Artemisinin digunakan sebagai pilihan obat antimalaria karena hingga saat ini artemisinin di-

tetapkan sebagai antimalaria dengan profil keamanan yang sangat baik karena mempunyai efek kerja lebih cepat daripada obat antimalaria yang lain dan mempunyai mekanisme kerja yang kompleks. Hasil penelitian *in vitro* pada *Plasmodium falciparum* yang dipapar obat antimalaria artemisinin berulang menunjukkan adanya pertumbuhan yang lebih cepat setelah *Plasmodium* viabel dari bentuk *dorman* (Maslachah, 2013). Hasil penelitian ini menjadi suatu gambaran akan terjadinya perkembangan resistensi secara *in vivo* pada manusia yang akan menjadi permasalahan kesehatan dunia karena belum ada obat baru pengganti artemisinin.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi, di Kandang Hewan Coba dan di Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2015.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan sebanyak 48 ekor. Mencit berumur 2,5 bulan dengan berat badan rata-rata 20 gram, diperoleh dari Pusat Veterinarian Farma (Pusvetma), Surabaya.

Bahan yang digunakan adalah pakan mencit, sekam sebagai alas kandang, air PDAM, aquades, *Plasmodium berghei* strain ANKA dari Lembaga Penyakit Tropik (LPT) Universitas Airlangga bagian Laboratorium Malaria, artemisinin pro analis (PA) dari Sigma Chemical Co, NaCl fisiologis, antikoagulan EDTA, gliserol, pewarna Giemsa, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), metanol, ketamin, formalin 10%, alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut,

parafin, xylol dan pewarna *Hematoxylin-Eosin* (HE).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba beserta penutup dari kawat, tempat pakan dan minum, *sputum* tuberkulin, sonde mencit, *mikrotube* 1,5 ml. Peralatan yang digunakan untuk insisi dan pembuatan preparat histopatologi organ meliputi gunting bedah, scalpel, pinset, pot obat untuk menyimpan organ, gelas ukur, bak parafin, kertas label, *object glass*, *cover glass*, *rotary microtome*, cawan petri, pipet pasteur, *oil* emersi dan mikroskop.

Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Kelompok kontrol, setelah inokulasi sel darah merah yang mengandung parasit *Plasmodium berghei* sebesar 1×10^5 dalam 0,2 ml pada tiap ekor mencit yang tidak diberi pengobatan hanya diberikan pelarut obat, selanjutnya parasitemia dimonitor dan dihitung pada 48 jam setelah infeksi. Apabila parasitemia telah mencapai $>2\%$, sel darah merah yang mengandung parasit pada 1 ekor mencit donor diambil untuk dipasase pada 6 ekor mencit kelompok berikutnya. Pasase berulang pada mencit dilakukan sampai 4 kali, mengacu pada penelitian terdahulu yang dilakukan secara *in vitro* dengan 4 kali pasase. Perkembangan parasit diikuti sampai hari ke 10 infeksi pada perlakuan K1, K2, K3 dan K4 (Kiboi *et al.*, 2009; Henriques 2013).

Kelompok perlakuan paparan obat antimalaria artemisinin, setelah inokulasi sel darah merah yang mengandung parasit *Plasmodium berghei* 1×10^5 dalam 0,2 ml pada tiap ekor mencit, kemudian diberi obat antimalaria artemisinin dengan dosis ED₉₉ (0,04 mg/g BB mencit) diberikan selama 3 hari dimulai pada 48 jam setelah infeksi (Fitri dkk, 2013).

Parasitemia dimonitor dan dihitung pada 48 jam setelah infeksi. Apabila parasitemia telah mencapai $>2\%$, sel darah merah yang mengandung parasit pada 1 ekor mencit donor diambil untuk dipasase pada 6 ekor mencit kelompok berikutnya, kemudian diberi obat artemisinin berulang pada hari ke 3, 4 dan 5 setelah infeksi, begitu seterusnya sampai 4 kali pada perlakuan P1, P2, P3 dan P4.

Pemeriksaan Preparat

Histopatologi Hepar

Pengamatan secara mikroskopis preparat histopatologi hepar mencit dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran kecil 100x, kemudian dilanjutkan dengan perbesaran 400x dan 1000x. Metode skoring derajat kerusakan hepar pada pemeriksaan ini dilakukan menurut metode Knodell (2000) dan Klopffleisch (2013) yang telah dimodifikasi, dimana derajat kerusakan dari setiap sampel ditentukan dengan cara menjumlah seluruh skor lesi histopatologik yang telah ditentukan.

Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam tabel berupa skor penilaian derajat mikroskopis dan histo-patologi sel hepar, dianalisis dengan uji *Kruskall-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji Z untuk perbandingan berganda.

Hasil dan Pembahasan

a. Tingkat Portal Inflamasi

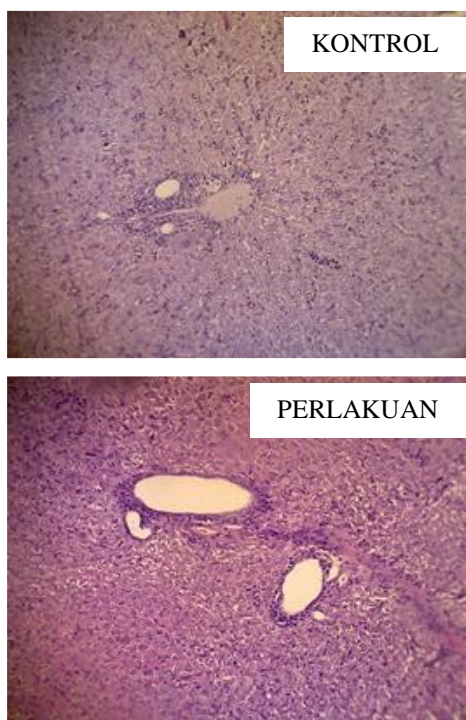
Tabel 2. Hasil uji statistik portal inflamasi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dipapar artemisinin berulang.

Perlakuan	Nilai Portal Inflamasi (Mean ± SE)
K1	13,30 ^b ± 4,5623
K2	26,30 ^a ± 3,7000
K3	18,90 ^{ab} ± 4,5316
K4	30,00 ^a ± 0,0000
P1	13,30 ^b ± 4,5623
P2	22,60 ^{ab} ± 4,5316
P3	13,30 ^b ± 4,5623
P4	26,30 ^a ± 3,7000

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf 5% ($p < 0,05$)

Tabel 2 di atas menunjukkan secara statistik K2, K4 dan P4 mengalami portal inflamasi tertinggi yang tidak berbeda nyata dengan K3 dan P2, sedangkan kelompok yang mengalami portal inflamasi terendah yaitu K1, P1 dan P3.

Gambaran histopatologi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mengalami portal inflamasi tertinggi dapat dilihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Gambaran histopatologi hepar pada kelompok kontrol dan perlakuan yang dipapar artemisinin berulang yang mengalami portal inflamasi tertinggi. (Pewarnaan H.E; Per-besaran 100x; Mikroskop Olympus®).
Ket. (→) : Adanya infiltrasi sel radang.

Hepatosit memiliki kemampuan untuk melakukan regenerasi sel, namun apabila jejas terus berlanjut maka akan diikuti dengan proses inflamasi (Kuntz and kunz, 2008). Inflamasi atau reaksi peradangan merupakan suatu respon protektif yang ditunjukkan tubuh untuk mempertahankan diri dari berbagai bahaya yang mengganggu keseimbangan dengan cara menghilangkan penyebab awal jejas sel. Inflamasi melaksanakan tugas pertahanannya dengan mengencerkan, menghancurkan atau menetralkan agen berbahaya (Atkinson *et al.*, 2008).

Pada kelompok kontrol yang hanya diinfeksi *Plasmodium berghei*, kerusakan jaringan hepar terjadi karena aktivitas parasit yang dalam siklus hidup perkembangannya berada pada organ hepar yang disebut fase skizogoni pre eritrosit (Nugroho, 2009). Kelompok mencit kontrol yang mengalami portal inflamasi disebabkan karena infeksi *Plasmodium berghei* hanya mampu dilawan menggunakan kekebalan alamiah yang terdapat dari dalam tubuh host. Padahal, pertumbuhan parasit di dalam tubuh host sendiri berkembang sangat cepat. Kerusakan hepar yang terjadi pada kelompok perlakuan disebabkan karena pemberian obat artemisinin berulang menyebabkan parasit mampu untuk bertahan hidup (viabel) lebih tinggi. Pada awal pengobatan pasase 1 menunjukkan kerusakan ringan, terlihat bahwa efek obat artemisinin bekerja dengan baik untuk membunuh parasit. Namun pada pasase 4 dengan paparan artemisinin

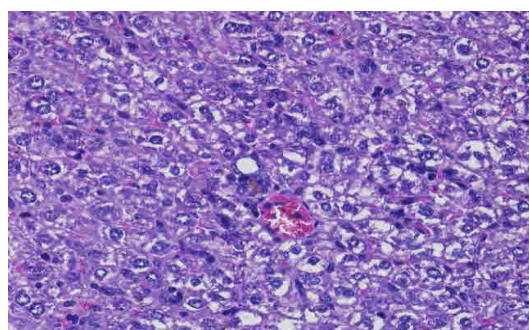
sebanyak 4 kali, terlihat bahwa peradangan yang terjadi terlihat lebih parah.

b. Tingkat Degenerasi

Tabel 3. Hasil uji statistik degenerasi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dipapar artemisinin berulang.

Perlakuan	Nilai Degenerasi (Mean ± SE)
K1	15,30 ± 5,0833
K2	18,10 ± 4,7707
K3	16,50 ± 6,1319
K4	15,90 ± 3,4293
P1	24,30 ± 5,3235
P2	20,90 ± 3,9699
P3	26,50 ± 5,4863
P4	26,50 ± 5,4863

Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3 di atas, dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata pada masing-masing kelompok perlakuan. Berikut ini adalah gambaran histopatologi hepar yang mengalami degenerasi pada pemeriksaan histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*).



Gambar 4.2 Gambaran histopatologi hepar yang mengalami degenerasi. (a) Sel hepatosit normal, (b) Degenerasi. (Pewarnaan H.E; Perbesaran 400x; Mikroskop Olympus®).

Kelompok kontrol yang tidak diberi paparan artemisinin mengalami degenerasi sebagai akibat dari infeksi *Plasmodium berghei* pada tubuh host yang tidak mendapatkan perlawanan spesifik dari penggunaan obat. Kelompok kontrol yang hanya diinfeksi *Plasmodium berghei*, mekanisme perlawanan yang terjadi di dalam tubuh host merupakan perlawanan alamiah yang berupa adanya fagositosis oleh makrofag terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Pada kelompok perlakuan yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberi artemisinin berulang juga menunjukkan adanya tingkat degenerasi. Hal ini terjadi karena parasit yang dapat hidup dan berkembang pada kelompok perlakuan dengan paparan berulang artemisinin pada pasase yang lebih tinggi menunjukkan bahwa efek kerja dari artemisinin sudah tidak mampu menyebabkan kematian pada parasit.

Hasil penelitian Rahardjo dkk, 2013 menyatakan bahwa pembengkakan sitoplasma sel hepatosit atau degenerasi merupakan kerusakan kedua dan ketiga yang banyak ditemukan pada struktur hati penderita malaria akibat *Plasmodium*. Degenerasi merupakan jejas sel yang reversibel yang ditandai dengan adanya pembengkakan sitoplasma akibat adanya akumulasi air atau lemak. Secara mikroskopik organ yang mengalami degenerasi menjadi lebih besar dan lebih berat daripada normal dan juga nampak lebih pucat. Nampak juga vakuola-vakuola kecil sampai besar dalam sitoplasma sel.

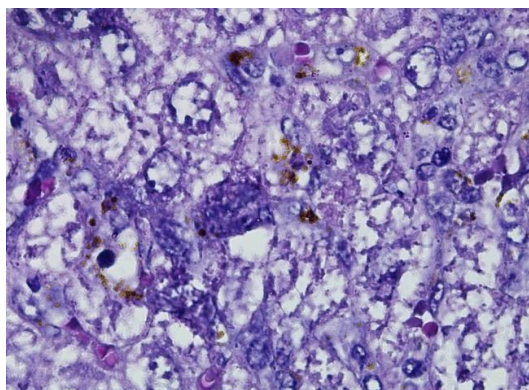
c. Tingkat Nekrosis

Tabel 4. Hasil uji statistik nekrosis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dipapar artemisinin berulang.

Perlakuan	Nilai Nekrosis (Mean \pm SE)
K1	18,30 \pm 3,8000
K2	18,30 \pm 3,8000
K3	18,30 \pm 3,8000
K4	22,10 \pm 4,6540
P1	11,80 \pm 2,7000
P2	22,10 \pm 4,6540
P3	22,10 \pm 4,6540
P4	31,00 \pm 4,3128

Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4 di atas, dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata pada masing - masing kelompok perlakuan.

Berikut ini adalah gambaran histopatologi hepar yang mengalami nekrosis pada pemeriksaan histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*).



Gambar 4.3 Gambaran histopatologi hepar yang mengalami nekrosis. (a) Inti sel hepatosit normal, (b) Inti sel piknotis, (c) Skizon *Plasmodium berghei* pada jaringan hepar. (Pewarnaan H.E; Perbesaran 1000x; Mikroskop Olympus®).

Pada gambaran histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*) yang mengalami nekrosis terlihat inti sel hepatosit mengalami penggumpalan /pemadatan (piknotis). Nekrosis yang disebabkan

oleh infeksi *Plasmodium berghei* terjadi karena sel darah merah yang mengandung merozoit menginfeksi eritrosit baru yang kemudian terjadi perlekatan pada permukaan endothel pembuluh darah dengan cara molekul adhesif eritrosit yang terinfeksi parasit berlekatan dengan molekul adhesif permukaan endothel pembuluh darah. Hal ini menyebabkan eritrosit yang diinfeksi parasit tinggal di dalam pembuluh darah dan terjadi mekanisme fagositosis terhadap parasit tersebut (Gandahusaha, 2006). Selain itu, anemia yang terjadi akibat infeksi malaria dapat menyebabkan terganggunya ikatan antara hemoglobin dan oksigen (Hb-CO₂) pada proses pengangkutan oksigen sehingga menyebabkan anoksia pada jaringan. Oksigen yang menuju ke jaringan terhambat menyebabkan penurunan fosforilasi oksidatif, penurunan ATP, penurunan glikolisis, dan penurunan pH, sehingga menyebabkan sel hepatosit mengalami nekrosis ditandai dengan inti sel yang mati akan menyusut, batasnya tidak teratur dan warna gelap, proses ini dinamakan dengan piknosis (McGavin and Zachari, 2007).

Semakin banyak jumlah paparan obat antimalaria artemisinin berulang pada mencit, menunjukkan kerusakan pada histopatologi hepar mencit semakin meningkat. Berdasarkan penelitian lanjutan yang telah dilakukan, setelah *Plasmodium berghei* terpapar artemisinin sebanyak 4 kali kemudian diinfeksi pada mencit kelompok baru tanpa pemberian obat artemisinin, menunjukkan peningkatan pertumbuhan parasit yang sangat tinggi. Hal ini dikarenakan *Plasmodium berghei* yang mengalami paparan berulang obat antimalaria artemisinin menyebabkan kemampuannya untuk bertahan hidup (viabel) lebih tinggi, selain itu kecepatan pertumbuhannya juga lebih cepat dari normal. Sehingga

menyebabkan kerusakan pada jaringan hepar semakin meningkat.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diperoleh kesimpulan bahwa pemberian artemisinin berulang dapat berpengaruh terhadap gambaran histopatologi berupa peningkatan portal inflamasi, degenerasi dan nekrosis hepar mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Daftar Pustaka

- Aidoo, M., Jaymin C. and John W. 2012. Dried *Plasmodium falciparum*-infected samples as positive controls for malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal*. 11: 2392.
- Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. 2008. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Wiley J and Sons. USA. 35-53.
- Baheti, R., Purnima L. and R.S. Gehlot. 2003. Liver Involvement in *Falciparum* Malaria - A Histopathological Analysis. *J. Indian Academy of Clinical Medicine*. 4(1).
- Fitri, L. E., Dara D., Dorta S., Soemarmo dan Karyono M. 2013. Efek Kombinasi Ekstrak *Anamirta cocculus* dan Artemisin terhadap Penurunan Jumlah Sel Apoptosis Jaringan Paru Mencit Malaria. *Majalah Kedokteran Bandung*. 45 (2).
- Gandahusada, Srisasi, Herry D. Iahude dan Wita Pribadi. 2006. *Parasitologi Kedokteran*. Ed 3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. 171-196.
- Henriques, G., Martinelli A., Rodrigues A., Modrzyńska K., Fawcett R., Houston DR *et al.* 2013. Artemisinin resistance in rodent malaria - mutation in the AP2 adaptor M-Chain Suggest Involvement of Endocytosis and Membrane Protein Trafficking. *Malaria Journal*. 12(118).
- Husin, Hasan. 2007. Analisis Faktor Risiko Kejadian Malaria di Puskesmas Sukamerindu Kecamatan Sungai Serut Kota Bengkulu Propinsi Bengkulu [Tesis]. Universitas Diponegoro Semarang.
- Kiboi D.M., Irungu B., Langat B., Wittlin S., Brun R., Chollet J., Abiodun O. and Nganga J.K. 2009. *Plasmodium berghei* ANKA: Selection of Resistance to Piperaquine and Lumefantrine in a Mouse Model. *Experimental Parasitology*. 122: 196-202.
- Klopfleisch R. 2013. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology - a systematic review. *Veterinary Research*, 9:123.
- Knodell. 2000. Grading and Staging the Histopathological Lesions of Chronic Hepatitis: The Knodell Histology Activity Index and Beyond. 31(1): 241- 246.
- Kuntz B. and Kunz H.D. 2008. *Hepatology Textbook and Atlas*. 3rd Ed. Sping medizin verlag Heidelberg. Germany. 16-77.
- Maslachah, L. 2013. Efek Paparan Artemisinin Berulang Terhadap Perkembangan *Plasmodium falciparum* Resisten in vitro [Disertasi]. Universitas Airlangga Surabaya.
- McGavin MD and Zachari JF. 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Inc. USA. 734-737.
- Nugroho, Yun Astuti. 2009. Pembuatan Formula Dan Uji Aktivitas Obat Anti Malaria Berbasis Buah Sirih Menggunakan Teknologi Vacuum Drying. Pusat Penelitian Pengembangan Biomedis Dan Farmasi. Jakarta.

- Rahardjo, Tur dan Siti Nurhayati. 2013. Histopatologi Hati dan Limpa Mencit Pasca Imunisasi Berulang dan Uji Tantang dengan *Plasmodium berghei* Iradiasi Gamma Stadium Eritrositik. Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi-BATAN. 359-360.
- Suwanti, Lucia T., Nunuk Dyah R. L., Endang Suprihati dan Mufasirin. 2012. Buku Ajar Ilmu Protozoologi Veteriner. Cetakan pertama. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair. Surabaya. 44.