

EKSPRESI mRNA INTERLEUKIN-10 (IL-10) DALAM KAITANNYA DENGAN PATOGENESIS MALARIA BERAT PADA MENCIT STRAIN BALB/C YANG DIINFEKSI *PLASMODIUM YOELII 17XL*

Sri Wijayanti Sulistyawati^{1,2,3}, Sukmawati Basuki^{1,2}, Yoes Prijatna Dachlan^{1,2}

¹ Departemen Parasitologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya

² Kelompok Studi Malaria, Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, Surabaya

³Program Studi S2 Immunologi, Universitas Airlangga, Surabaya

e-mail: *yanti.parasito@gmail.com, sukmabas@yahoo.com, yoedachlan.rspti@gmail.com

Abstrak

*Patogenesis malaria berat masih belum diketahui menyeluruh. Episode malaria berat dapat disebabkan oleh dua keadaan, produksi tinggi pada fase awal IL-10 dan atau kurangnya produksi IL-10 pada fase transisi. Peran IL-10 pada malaria masih belum jelas diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi IL-10 dalam kaitannya dengan patogenesis malaria berat pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL*.*

*Penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan “post test only control group design” dilakukan, dan menggunakan 24 mencit strain BALB/c, betina, usia 7-8 minggu, yang dibagi menjadi 4 kelompok. Mencit BALB/c diinfeksi secara intraperitoneal dengan 1×10^5 *P. yoelii 17XL*, dan dikorbankan pada hari ke-3 dan ke-6 pasca infeksi. Parasitemia dan kadar hemoglobin diperiksa setiap hari. Jaringan limpa diambil untuk isolasi RNA. Ekspresi mRNA IL-10, TNF α , dan IFN γ dianalisis dengan RT-PCR.*

*Mencit BALB/c diinfeksi dengan 1×10^5 *P. yoelii 17XL* menunjukkan infeksi letal, yang ditandai dengan peningkatan parasitemia sejalan dengan penurunan kadar hemoglobin, terjadi setelah hari ke-3 pasca infeksi. Ekspresi mRNA IL-10, begitu pula dengan TNF α dan IFN γ pada hari ke-3 pasca infeksi menunjukkan peningkatan dibandingkan pada kontrol dan hari ke-6 pasca infeksi.*

*Tidak adanya ekspresi IL-10 pada H6, menunjukkan kemungkinan adanya kegagalan regulator mengontrol malaria berat pada infeksi *P. yoelii 17XL* pada mencit BALB/c.*

Kata kunci— mRNA IL-10, RT-PCR, patogenesis malaria berat, mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL*

Abstract

The pathogenesis of severe malaria is still unsolved. The role of IL-10 in the pathogenesis of malaria still unclear. This study was aimed to analyze mRNA expression of IL-10 on the pathogenesis of severe malaria in strain BALB/c mice infected with P. yoelii 17XL.

The laboratory experimental research with post test only-control group design was conducted. A total of 24 BALB/c mice, female, age 7-8 weeks, were divided into 4 groups. BALB/c mice were infected intraperitoneally with 1×10^5 P. yoelii 17XL, and were sacrificed on Day-3 and Day-6 post infection. Parasite count and hemoglobin level were observed daily. Spleen tissues were collected for RNA isolation. mRNA expressions of IL-10, TNF α and IFN γ were analysed by RT-PCR technique.

BALB/c mice infected with P. yoelii 17XL caused lethal infection with signs of increasing parasitemia synchronize with the decreasing levels of hemoglobin after the day-3 post-infection. Expression of mRNA of IL-10, TNF α , and IFN γ were increased on the day 3 post infection, compared with day 0 and day 6 post infection.

This study suggested that the absent of mRNA expression of IL-10 on day 6 may indicate the failure of regulator in controlling severe malaria in P. yoelii 17XL infection on BALB/c mice.

Keywords— *mRNA IL-10, RT-PCR, pathogenesis of severe malaria, BALB/c mice infected by P. yoelii 17XL*

1. PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit parasit yang terpenting. Pada tahun 2010, terdapat 216 juta kasus malaria dan sedikitnya 655 ribu kematian di dunia, terutama pada anak-anak yang tinggal di Afrika (WHO, 2010). Sampai saat ini, di Indonesia malaria masih menjadi masalah kesehatan. Pada tahun 2009 di Indonesia terdapat 544.470 kasus yang dilaporkan, dengan tingkat kematian sebesar 900 per 100.000 penduduk (WHO-SEARO, 2011).

Fenotip klinis infeksi malaria sangat bervariasi (Riley et al, 2006). Keseluruhan pola penyakit dipengaruhi secara nyata oleh umur dan reaksi imun yang dialami hospes (Schofield and Grau, 2005). Alasan yang mendasari perbedaan tersebut belum dipahami sepenuhnya (Angulo and Fresno, 2002). Pemahaman mengenai dasar imunologi mengenai imunitas protektif terhadap malaria dibutuhkan seiring dengan peningkatan multi resistensi terhadap anti malaria disertai resistensi vektor terhadap insektisida yang ada (Hassan et al, 2010; Niikura et al, 2011).

Sebagian besar patologi infeksi malaria disebabkan oleh respon inflamasi yang berlebihan terhadap parasit. Sitokin regulatori interleukin-10 (IL-10) diketahui berperan penting untuk mengontrol inflamasi selama infeksi malaria dan memberikan proteksi terhadap imunopatologi, akan tetapi dapat pula mengurangi efektivitas mekanisme imun lainnya dalam mengeliminasi parasit. Untuk mendisosiasi kedua efek IL-10 tersebut, yang memungkinkan kontrol infeksi dan pencegahan patologi berjalan signifikan, perlu pemahaman yang lebih baik mengenai proses produksi IL-10, waktu produksi, dan sel-sel yang memproduksi (Couper et al, 2008).

Data mengenai IL-10 pada manusia masih kontradiktif. Proporsi IL-10 bertambah dengan usia dan berbanding terbalik dengan kasus malaria berat, dan respon IL-10 terhadap peptida *Plasmodium* bertahan hingga 3 tahun pada masyarakat dari wilayah dengan intensitas transmisi malaria yang berbeda. Pada area dengan endemisitas rendah respon IFN γ menurun sesuai dengan

waktu, respon IL-10 sel MN perifer stabil hingga 6 tahun (Freitas do Rosario and Langhorne, 2012). Penelitian Long et al menemukan keterlibatan IL-10 dalam pencegahan keparahan penyakit, juga kemungkinan bahwa polimorfisme IL-10 mempengaruhi derajat keparahan malaria telah diinvestigasi, meskipun masih dipertentangkan (Penman and Gupta, 2008). Kadar IL-10 yang tinggi berhubungan dengan penurunan produksi IFN γ yang menyebabkan anemia yang parah pada infeksi *Plasmodium falciparum* (Niikura et al, 2011). Pada anak-anak di Ghana yang menderita malaria falsiparum, kadar IL-10 dalam sirkulasi yang rendah berhubungan dengan anemia malaria yang berat (Wilson et al, 2005). Namun, kadar IL-10 diiringi TNF α yang tinggi juga dilaporkan pada kasus malaria berat dan dengan komplikasi serta pada malaria anak dengan parasitemia yang tinggi (Othoro et al, 1999; Keller et al, 2006). Rasio IL-10/TNF yang rendah berhubungan dengan anemia malaria berat (Niikura et al, 2011). Hubungan antara IL-10 dengan sitokin lain penting dalam sistem imun terhadap malaria.

Pada infeksi malaria di mencit, diketahui efek negatif, maupun efek protektif IL-10 terhadap respon inflamasi (Niikura et al, 2011). Sekresi IL-10 pada fase awal infeksi *P. yoelii* berhubungan dengan respon IFN γ dan TNF α yang tumpul dan memanjang (Freitas do Rosario and Langhorne, 2012). Pada mencit dengan *IL-10-deficient* terjadi supresi peningkatan parasitemia selama koinfeksi parasit letal dan nonletal, namun terjadi kegagalan eliminasi parasit komplisit dan menyebabkan kematian (Niikura et al, 2011).

Studi mengenai *severe malaria* dengan hewan coba penting untuk pemahaman mengenai pathogenesis malaria, khususnya peranan IL-10 pada patogenesis *severe malaria*, penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ekspresi mRNA IL-10 pada limpa mencit strain BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii* 17XL dalam kaitannya dengan patogenesis malaria berat.

2. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan *post test only control group design* (Zainuddin, 2000), dan telah layak etik (Keterangan Kelaikan Etik KEPK FKUA No 035/EC/KEPK/FKUA/2012) dan dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan.

Sampel penelitian adalah mencit strain BALB/c sehat, betina dan berusia 7 – 8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada (UGM) sebanyak 24 ekor. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (kontrol negatif), kelompok perlakuan (dibagi menjadi dua kelompok, yaitu H3 dan H6), kelompok survival (kontrol positif). Kelompok perlakuan dan kelompok survival merupakan mencit BALB/c yang diinfeksi secara injeksi intraperitoneal sebanyak 1×10^5 *P. yoelii* 17XL. Kelompok survival merupakan kelompok perlakuan yang diamati sampai mati.

P. yoelii 17XL diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. *P. yoelii* 17XL adalah strain parasit yang hanya menginfeksi mencit. Mencit tersebut akan mengalami malaria berat yang ditandai dengan anemia berat (Hb < 5gr%) dan hiperparasitemia (parasitemia darah tepi > 5%) (WHO, 2010), berakhir dengan kematian (bersifat letal). Sebelum diinfeksi dilakukan dua kali pasase, kemudian dilakukan infeksi sebanyak 1×10^5 *P. yoelii* 17XL secara intraperitoneal pada setiap mencit. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar hemoglobin (Hb) dan parasitemia setiap hari.

Pemeriksaan parasitemia dan kadar hemoglobin dilakukan setiap hari dengan menggunakan sampel darah dari ekor mencit. Pengukuran kadar parasitemia dilakukan berdasarkan ketentuan WHO (1991), yaitu dengan cara menghitung persen parasit di dalam 1.000 eritrosit (termasuk eritrosit yang terinfeksi parasit) pada sediaan hapusan darah tipis yang telah dicat dengan larutan Giemsa 5% dalam *phosphate buffer saline* (PBS).

Sedangkan pemeriksaan Hb dilakukan dengan metode sahli (Assistent, Germany) dengan satuan gr/dl (Depkes RI, 1991). Mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ketiga paska infeksi (kelompok H3) dan pada hari keenam paska infeksi (kelompok H6) dikorbankan dan diambil limpanya. Jaringan limpa yang diperoleh kemudian digunakan untuk isolasi RNA.

Ekspresi mRNA IL-10, TNF α dan IFN γ dianalisis dengan tehnik RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), dengan tahap-tahap ekstraksi RNA untuk mendapatkan total RNA menggunakan reagen TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, USA), dilanjutkan dengan penambahan oligoDT (AIT Biotech, Singapore) untuk mendapatkan mRNA dan proses *Reverse Transcription* menggunakan enzim MMLV (10.000 U *cloned moloney murine leukemia virus* (MMLV) *reverse transcriptase enzyme*) (Promega Corporation, Madison, USA) untuk mendapatkan cDNA, selanjutnya dilakukan PCR dengan sampel cDNA. Amplifikasi cDNA dilakukan dalam larutan PCR yang mengandung 10mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, MgCl $_2$ pada konsentrasi akhir 1,5mM, dNTPs pada konsentrasi akhir 0,2 mM, 50 pmol setiap primer 2,5 U Taq DNA polymerase (Takara Ltd, Japan). Selanjutnya cDNA diamplifikasi dengan primer spesifik mencit (Genecraft Labs, German) sebagai berikut dalam tabel 1. DNA diamplifikasi menggunakan siklus denaturasi pada suhu 94 $^{\circ}$ C selama 5 menit, 35 kali siklus *annealing* pada suhu 94 $^{\circ}$ C selama 1 menit, 60 $^{\circ}$ C selama 1 menit, 72 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan *final extension* pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 20 menit. Pada RT-PCR ini, digunakan β -actin sebagai kontrol internal. Elektroforesis dilakukan pada 10 μ l DNA yang telah diamplifikasi dalam 1,5% agarose-TAE yang mengandung ethidium bromide 0,5 μ g/ml. Selanjutnya ekspresi sitokin dari DNA yang telah diamplifikasi diidentifikasi dibawah sinar ultra violet (UV) (Iwaki, Japan) dan didokumentasi menggunakan kamera digital (Olympus Optical Co, Japan).

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan *student t-test* dan korelasi Pearson dengan *software* SPSS.

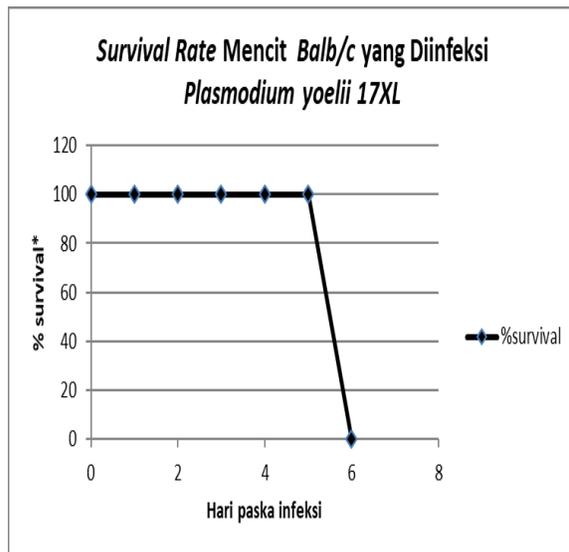
Tabel 1. Primer yang digunakan untuk RT-PCR

Sitokin		Nukleotida	Referensi
TNF α	sense	GAAGCATGATCCGCGACG TGG	Kita et al, 2000
	antisense	GTAGACCTGCCCCGACTC CGCAA	
IL-10	sense	TCAAACAAAGGACCAGCT GGACAACATACTG	Kita et al, 2000
	antisense	CTGTCTAGGTCCTGGAGT CCAGCAGACTCAA	
IFN γ	sense	ACTGCCACGGCAGACTCA	Kita et al, 2000
	antisense	GCGACTCCTTTTCCGCTT	
β -actin	sense	GTTACCAACTGGGACGAC A	Kita et al, 2000
	antisense	TGGCCATCTCCTGCTCGA A	

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan dan hasil sebagai berikut :

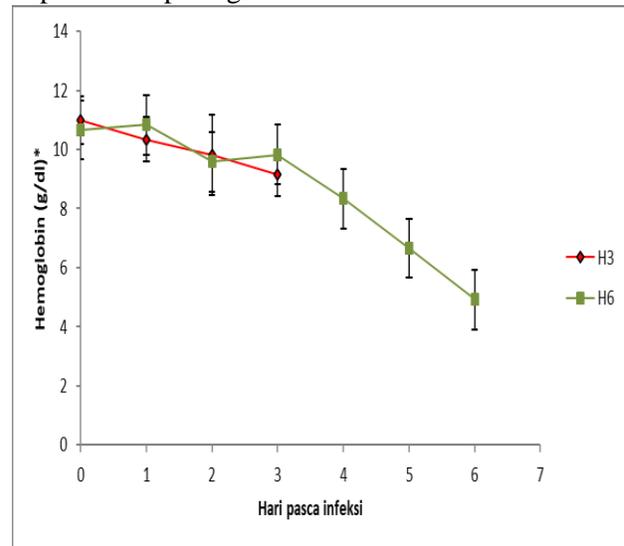
Mencit pada kelompok survival digunakan untuk melihat masa hidup mencit BALB/c yang diinfeksi *P.yoelii 17XL*. Didapatkan bahwa terdapat sampel yang homogen karena seluruh mencit kelompok survival mati pada hari ke-6, seperti dapat dilihat pada grafik 1.



*%survival dihitung berdasarkan persentase jumlah mencit BALB/c yang hidup setelah diinfeksi *P.yoelii 17XL*, diamati setiap hari

Grafik 1. Masa Hidup Mencit BALB/c yang diinfeksi *P.yoelii 17XL*

Kadar hemoglobin mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL* cenderung mengalami penurunan selama perlakuan, yaitu pada kelompok H3 dari 11 g/dl saat sebelum infeksi menjadi 9,2 g/dl pada hari ke-2 paska infeksi, sedang pada kelompok H6 dari 10,7 g/dl menjadi 9,8 g/dl. Setelah hari ke-3 paska infeksi kadar hemoglobin mengalami penurunan yang semakin besar hingga pada kelompok H6 hari ke-6 paska infeksi mencapai kadar hemoglobin 4,9 mg/dl seperti dapat dilihat pada grafik 2.

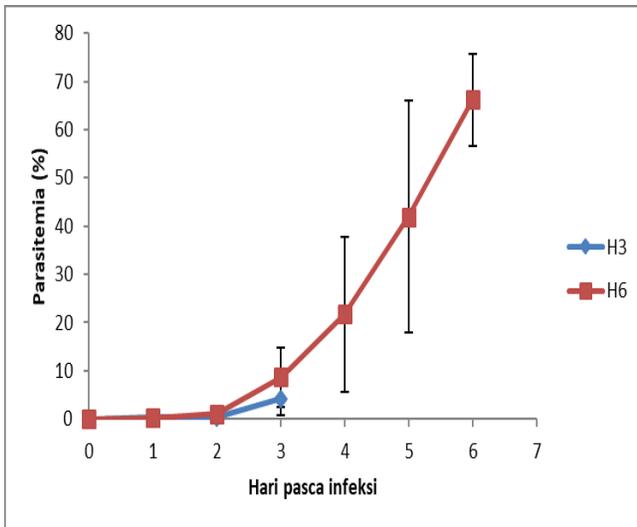


*Kadar hemoglobin diukur menggunakan metode Sahli (g/dl), sediaan darah diambil dari ujung ekor (mean \pm SD). Jumlah mencit pada setiap kelompok : 6 ekor.

Grafik 2. Kadar Hemoglobin mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL* secara intraperitoneal.

Perbandingan Hb antara kelompok H0, H3, dan H6 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) (lihat tabel 2). Hal ini dibuktikan pula dengan perbedaan signifikan antara kelompok H0 dan H6 ($p < 0,05$), serta kelompok H3 dan H6 ($p < 0,05$), namun antara kelompok H0 dan H3 tidak signifikan (lihat tabel 2). Sehingga dapat dikatakan terjadi penurunan kadar hemoglobin, yang nyata terlihat setelah hari ke-3 paska infeksi.

Parasitemia mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL* diperiksa setiap hari setelah infeksi. Hasil pemeriksaan menunjukkan parasitemia dapat dideteksi mulai hari pertama setelah injeksi, meskipun parasitemia yang terjadi pada hari pertama hingga kedua paska infeksi relatif rendah, yaitu pada kelompok H3 sebesar 0,33% (hari ke-1) dan 0,36% (hari ke-2), pada kelompok H6 sebesar 0,26% (hari ke-1) dan 1,04% (hari ke-2). Parasitemia mulai paten pada hari ketiga setelah infeksi, dan terus meningkat dengan cepat hingga mencapai 66,16 % pada kelompok H6 di hari keenam paska infeksi (lihat grafik 3).



Grafik 3. Parasitemia* mencit BALB/c yang diinfeksi 10^5 *P. yoelii 17XL* secara intraperitoneal.

*Parasitemia dihitung berdasarkan persentase jumlah eritrosit terinfeksi dalam 1.000 eritrosit normal yang diperiksa dari sediaan hapusan darah yang dicat Giemsa dan diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1.000x (mean \pm SD).

H3: Kelompok yang dikorbankan pada hari ke-3, H6: Kelompok yang dikorbankan pada hari ke-6, Jumlah mencit pada setiap kelompok : 6 ekor.

Analisis statistik menunjukkan adanya peningkatan parasitemia yang signifikan pada H6 bila dibandingkan dengan H3 ($p < 0,05$) (lihat tabel 2).

Tabel 2. Perbandingan kadar hemoglobin antara kelompok H0, H3 dan H6 pada Mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL*

Variabel	Kelompok*			harga p
	H0	H3	H6	
Kadar Hemoglobin (g/dl)	10.67 \pm 0.82 ^a	9.2 \pm 1.17 ^a	4.9 \pm 1.8 ^b	<0.0001
Parasitemia (% iRBC per 1000 eritrosit normal)	-	4.2 \pm 3.3 ^c	66.16 \pm 9.45 ^d	0.031

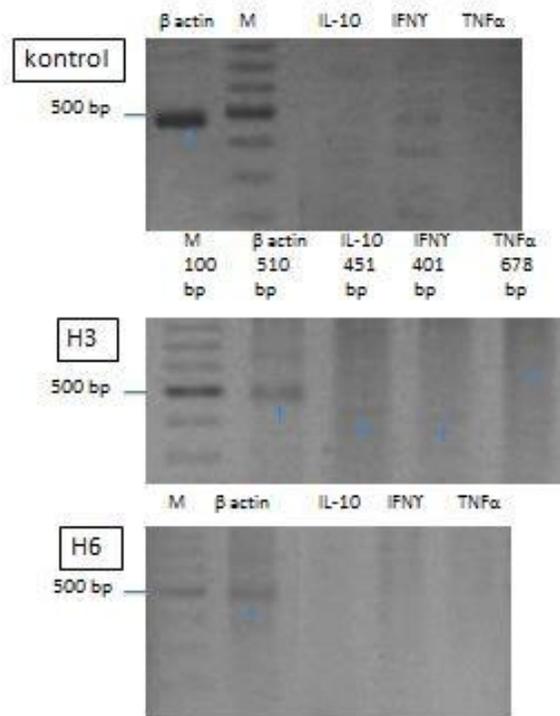
Notasi huruf a dan b dalam satu baris adalah berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Notasi huruf c dan d dalam satu baris adalah berbeda secara signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 3. Tabel korelasi antara variabel-variabel pada Mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL*

	Parasitemia (% iRBC per 1000 eritrosit normal)	Kadar Hemoglobin (g/dl)
Parasitemia (% iRBC per 1000 eritrosit normal)	-	$r = -0.898$ $p < 0.0001$
Kadar Hemoglobin (g/dl)	$r = -0.898$ $p < 0.0001$	-

Hubungan antara parasitemia dengan Hb menunjukkan korelasi yang signifikan ($p < 0,01$) (lihat tabel 3). Hal ini menunjukkan terjadi peningkatan parasitemia yang nyata terlihat setelah hari ke-3 paska infeksi, sejalan dengan penurunan kadar hemoglobin.

Hasil RT-PCR pada limpa mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17 XL* menunjukkan mRNA IL-10 pada H0 (sebelum diinfeksi) tidak terekspresi, begitu pula dengan IFN γ dan TNF α pada H0 (sebelum diinfeksi) tidak terekspresi, sedangkan pada H3 (hari ke-3 paska infeksi) terlihat ekspresi mRNA IL-10, IFN γ dan TNF α . Pada H6 (hari ke-6 paska infeksi) mRNA IL-10, IFN γ dan TNF α , kembali tidak terekspresi (lihat gambar 1).



Gambar 1. Hasil pemeriksaan RT-PCR limpa mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL*.

Ket :H0 ; kontrol negatif, H3: kelompok yang dikorbankan pada hari ke-3 paska infeksi 1×10^5 *P. yoelii 17XL*, H6: kelompok yang dikorbankan pada hari ke-6 paska infeksi 1×10^5 *P. yoelii 17XL* ; RT-: sampel yang tidak diberi enzim MMLV;M: marker (penanda);RT+: kontrol internal (menggunakan β -actin)

Pemahaman mekanisme malaria berat sangat tergantung pada penelitian dengan model malaria pada mencit (Zhu et al, 2012).

P. yoelii 17XL merupakan parasit yang dapat menyebabkan anemia berat (Weissberg et al, 2012; Fu et al, 2012; Zhu dll,2012; Totino et al, 2010; Langhorne, 2005) dan bersifat letal (Kobayashi et al, 1996;Couper et al, 2008;Jaular et al, 2011)

Manifestasi yang didapat pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian lain yang serupa, yaitu adanya anemia (Fu et al, 2012; Totino et al, 2010), hiperparasitemia (Fahey and Spitalny, 1984; Zhu et al, 2012;Fu et al, 2012;Totino et al, 2010; Sanni et al, 2002; Langhorne, 2002; Scholzen, 2009). Hal ini menjelaskan bahwa model infeksi malaria *P. yoelii 17XL* pada mencit BALB/c ini dapat digunakan sebagai hewan coba untuk

mempelajari imunopatogenesis malaria (Waisberg et al, 2012;Fu et al, 2012;Zhu dll,2012; Jaular et al, 2011; Totino et al, 2010; Couper et al, 2008;Langhorne, 2005). Malaria berat pada model hewan coba ini terjadi pada hari ke-4 paska infeksi apabila dilihat dari tingkat parasitemia, sedangkan apabila didasarkan tingkat anemia, malaria berat terjadi pada hari ke-6 paska infeksi.

Penelitian ini menjelaskan patogenesis malaria berat dan letalitas yang terjadi, dengan manifestasi utama pada anemia berat dan hiperparasitemia, sesuai dengan kriteria WHO tahun 2010.

Ciri khas yang membedakan infeksi *P. yoelii* strain letal dan nonletal adalah kemampuan *P. yoelii* strain letal untuk menginvasi eritrosit matur, produksi dini sitokin antiinflamatori, dan aktivasi Treg CD4+CD25+ (Fu et al, 2012).

Hasil analisis RT-PCR menunjukkan ekspresi mRNA IL-10, TNF- α , dan IFN- γ yang meningkat pada H3, sedangkan pada H0 dan pada H6 tidak terekspresi. Hal ini berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan peningkatan kadar IL-10 yang terus meningkat pada minggu pertama selama infeksi malaria mencit (Couper et al, 2008;Kobayashi et al, 1996; Shibui et al, 2009). Berbeda pula dengan penelitian yang dilakukan oleh Millington et al (2006), yaitu dengan eksperimen malaria in vivo dan in vitro, mendapatkan hasil kadar sitokin IL-10, IL-12, dan IL-2, IFN γ yang sangat rendah sejak hari pertama infeksi.

Perbedaan hasil yang didapat pada penelitian ini kemungkinan karena penelitian ini menggunakan RT-PCR untuk mengukur kadar mRNA, sedangkan penelitian Couper et al, 2008; Kobayashi et al, 1996; Shibui et al, 2009, dilakukan dengan menggunakan ELISA untuk mengukur kadar protein. Perbedaan kadar mRNA dan protein, dapat disebabkan ekspresi protein yang sangat rendah, sensitifitas teknik, proses sampel, dan perbedaan area transkripsi dengan protein yang dihasilkan (Pascal et al, 2008).

Pada penelitian ini diperkirakan terjadi produksi dini IL-10 pada awal infeksi dan immunosupresi pada akhir infeksi.

Interpretasi pada fase awal (hari ke-3 paska infeksi) sejalan dengan Hassan et al, yang menyatakan bahwa produksi IL-10 dengan konsentrasi tinggi pada fase awal yang paralel dengan produksi TNF α yang persisten dan nyata akan merubah keadaan dari infeksi ringan menjadi bentuk yang berat. Hal ini didasarkan pada fakta bahwa produksi pada fase awal dari IL-10 menghambat pelepasan IL-12 dan konsekuensinya menghambat pula IFN γ yang dibutuhkan untuk klirens parasit malaria. Selain itu, sekresi persisten TNF α disertai dengan penurunan produksi IL-10 dan TGF- β selama fase transisi dari respon imun *innate* menuju respon imun adaptif juga akan menyebabkan progresifitas ke arah malaria berat.

Interpretasi pada hari ke-6 paska infeksi (*late infection*) yaitu tidak didapatkan ekspresi IL-10, TNF α , dan IFN γ , sejalan dengan penelitian Millington et al (2006).

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi IL-10, TNF α , dan IFN γ pada awal infeksi namun tidak didapatkan ekspresi IL-10 dan sitokin-sitokin lain pada akhir infeksi, sehingga diperkirakan letalitas dan hiperparasitemia yang terjadi disebabkan proses inflamasi pada awal infeksi dan immunosupresi pada akhir infeksi.

Letalitas parasit *P. yoelii 17XL* terjadi karena parasitemia meningkat persisten, tidak terdapat respon Th1 yang efektif yang ditandai dengan produksi dini IFN γ . Hal ini sesuai dengan Zhu et al (2012).

Hiperparasitemia yang tinggi menunjukkan kontrol parasit yang tidak efektif, yang seharusnya diperankan oleh IFN γ , IL-12, dan IL-18, hal ini sesuai dengan Wroczynska (2005).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian pada anak-anak di Ghana yang terkena malaria falsiparum, kadar IL-10 dalam sirkulasi yang rendah berhubungan dengan anemia malaria yang berat (Wilson et al, 2005). Namun, kadar IL-10 dan TNF α yang tinggi juga dilaporkan pada kasus malaria berat dan dengan komplikasi serta pada malaria anak dengan parasitemia yang tinggi (Othoro et al, 1999; Keller et al, 2006). Rasio IL-10 terhadap TNF yang tinggi dilaporkan pada pasien malaria falsiparum pada daerah

endemis dengan malaria tanpa komplikasi atau hiperparasitemia (Trinchieri, 2001).

Masih terdapat hasil yang kontradiktif mengenai IL-10 pada infeksi malaria di manusia.

Pada penelitian ini, tidak didapatkan hasil yang persis sama dengan yang terjadi pada manusia. Perjalanan dan keparahan penyakit tergantung pada usia, konstitusi genetik, imunitas spesifik malaria, status nutrisi, dan paparan terhadap obat antimalaria (Crawley et al, 2010). Hal ini tidak terjadi pada model hewan coba mencit, yang merupakan keterbatasan hewan coba, sehingga gambaran perjalanan klinisnya tidak persis dengan pada manusia.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Terdapat ekspresi mRNA IL-10, TNF α dan IFN γ pada model mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL* pada hari ke-3 paska infeksi dibandingkan kontrol. Hal ini disertai dengan peningkatan parasitemia yang sejalan dengan penurunan kadar hemoglobin, nyata terlihat setelah hari ke-3 paska infeksi,

Namun pada hari ke-6 paska infeksi *P. yoelii 17XL* pada mencit BALB/c tidak didapatkan ekspresi mRNA IL-10, TNF α dan IFN γ . Tidak adanya ekspresi mRNA IL-10 pada hari ke-6 paska infeksi menunjukkan kemungkinan adanya kegagalan regulator respon imun dalam infeksi malaria berat. Diperkirakan letalitas dan hiperparasitemia yang terjadi disebabkan proses inflamasi pada awal infeksi dan immunosupresi pada akhir infeksi.

Penelitian lanjut kadar dan ekspresi protein IL-10 sangat diperlukan dengan interval waktu pemeriksaan yang lebih sempit, maupun dengan menggunakan metode lain seperti ELISA, Real Time PCR, atau imunohistokimia, untuk menjelaskan aspek molekular pada respon imun terhadap *P. yoelii 17XL*. Juga diperlukan pemeriksaan komponen imun lain yang dapat menggambarkan kondisi immunosupresi dan memperjelas patogenesis malaria misalnya GM-CSF, hitung eritrosit, hitung monosit, hitung retikulosit, dan lain-lain

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Bu Rita Marletta dan Bpk Ondri Dwi Sampurno dari BALITBANGKES atas pemberian isolat *P. yoelii*, Haruki Uemura, PhD dari Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, atas bantuan sebagian besar alat dan bahan penelitian, dan segenap staf LPT UNAIR yang telah membantu pemeliharaan hewan coba dan seluruh staf Kelompok Studi Malaria yang telah membantu memperlancar penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Angulo I and Fresno M, 2002. Cytokines in the Pathogenesis of and Protection against *Malaria*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(6):1145-1152.
- Couper KN et al, 2008. IL-10 from CD4+CD252Foxp32CD1272 Adaptive Regulatory T Cells Modulates Parasite Clearance and Pathology during Malaria Infection. *PLoS Pathog* 4(2): e1000004
- Crawley J, Chu C, Nosten F. Malaria in children *Lancet* 2010; 375: 1468–81
- Depkes RI : *Petunjuk Pemeriksaan Laboratorium Puskesmas, 1991*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI
- Fahey JR and Spitalny, 1984. Virulent and Nonvirulent Forms of *Plasmodium yoelii* Are Not Restricted to Growth Within a Single Erythrocyte Type. *Infection and Immunity* 44(1):151-156
- Freitas do Rosario AP and Langhorne J, 2012. T cell-derived IL-10 and its impact in the regulation of host responses during malaria. *International Journal for Parasitology*
- Fu Y, Ding Y, Zhou T, et al, 2012. Comparative Histopathology of Mice Infected With the 17XL and 17XNL Strains of *Plasmodium yoelii*. *Journal of Parasitology*, 98(2):310-315
- Hassan et al, 2011. Cytokines and their role in modulating the severity of *Plasmodium falciparum* malaria. *Khartoum Medical Journal* 3 (1) :373-376
- Jaular LM et al, 2011. Strain-specific spleen remodelling in *Plasmodium yoelii* infections in Balb/c mice facilitates adherence and spleen macrophage-clearance escape. *Cellular Microbiology* 13(1):109-122
- Keller CC et al, 2006. Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12p40 (IL-12p40) Transcripts and Circulating IL-12p70 through an IL-10-Dependent Mechanism: In Vivo and In Vitro Findings in Severe Malarial Anemia. *Infection and Immunity* 74(9):5249–5260
- Kita M, Tong L, Tanaka K, Imanishi J, 1992. Expression de l'ARNmessenger des cytokines chez la Souris dans des condition physiologiques. *Int Immunol* 4 (4): 475-485
- Kobayashi F, Morii T, Matsui T, et al, 1996. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii* *Parasitol Res* (1996) 82:385-391
- Langhorne J et al, 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature immunology* 9 (7) : 725-732
- Langhorne J, Quin SJ, and Sanni LA, 2002. Mouse models of bloodstage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. Dalam (Perlmann PT and Blomberg M, eds). *Malaria Immunology, Chem. Immunol. Basel* :Karger 80:204–228
- Long G H et al, 2008. Experimental manipulation of immune-mediated disease and its fitness costs for rodent malaria parasites. *BMC Evolutionary Biology* 8:128
- Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips R.S, Garside P, and Brewer J.M, 2006. Suppression of adaptive

- immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol* 5: 5.
- Niikura M, Inoue S, Kobayashi F, 2010. Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing on Coinfection with Lethal and Nonlethal Murine Malaria Parasite. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*:1-8
- Othoro C et al, 1999. A Low Interleukin-10 Tumor Necrosis Factor- α Ratio Is Associated with Malaria Anemia in Children Residing in a Holoendemic Malaria Region in Western Kenya. *The Journal of Infectious Diseases* 179:279–82
- Pascal LE, True LD, Campbell DS, et al, 2008. Correlation of mRNA and protein levels: Cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*9:246
- Penman B and Gupta S, 2008. Evolution of virulence in malaria. *Journal of Biology* 7:22
- Riley EM et al, 2006. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunology* 28:35–49
- Sanni LA, Fonseca LF, Langhorne J, 2002. Mouse models of erythrocytic-stage malaria Dalam (Doolan DL, eds). *Malaria Methods and Protocols*. Humana Press 72: 57-62
- Schofield L and Grau GE. 2005. Immunological Processes in Malaria Pathogenesis. *Immunology*. Nature Publishing Group 5 :722-735
- Scholzen A, Minigo G, Plebanski M, 2009. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends in Parasitology* 26(1): 16-25
- Shibui A et al, 2009. CD4⁺ T cell response in early erythrocytic stage malaria: *Plasmodium berghei* infection in BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasitol Res* 105:281–286.
- Totino P RR, Magalhaes AD, Silva LA, et al., 2010, Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malaria Journal* 9:350
- Trinchieri G, 2001. Regulatory Role of T Cells Producing both Interferon γ and Interleukin 10 in Persistent Infection. *J. Exp. Med* 194(10) : F53-F57
- Waisberg M, Vickers BK, Yager SB, et al, 2012. Testing in Mice the Hypothesis That Melanin Is Protective in Malaria Infections. *PlosOne* 7(1): e29493
- WHO, 1991. *Basic Malaria Microscopy Part I. Learner's Guide*. Geneva, Switzerland
- WHO, 2010, *Guidelines for the treatment of Malaria*, 2nd ed, Geneva, Switzerland
- WHO, 2010, *World Malaria Report*, Geneva, Switzerland
- WHO-SEARO, 2011. *Malaria Situation*, Geneva, Switzerland
- Wilson JN et al, 2005. Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. *Genes and Immunity* 6: 462–466
- Wroczynska A, Nahorski W, Bakowska A, et al, 2005. Cytokines and Clinical Manifestations of Malaria in Adults with Severe and Uncomplicated Disease. *Internat. Marit. Health* 56: 1 – 4
- Zainuddin A, 2000. *Metode Penelitian. Program Pasca Sarjana Unair, Surabaya*, hlm 73-74
- Zhu X, Pan Y, Zheng L, et al, 2012, Polysaccharides from the Chinese medicinal herb *Achyranthes bidentata* enhance anti-malarial immunity during *Plasmodium yoelii* 17XL infection in mice. *Malaria Journal* 11:49