

**TINGGINYA KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR- α (TNF- α) PLASMA
PADA MENCIT BUNTING YANG TERINFEKSI *PLASMODIUM BERGHEI*
BERHUBUNGAN KUAT DENGAN KADAR HEMOGLOBIN YANG RENDAH
TETAPI TIDAK BERHUBUNGAN DENGAN BERAT BADAN JANIN RENDAH**

Yuliyani

Yuliyani_wabiser@yahoo.com

Prodi Kebidanan STIKES Widyagama Husada

ABSTRACT

Malaria infection in pregnancy may increase the morbidity and mortality of both mother and fetus. In pregnant women, it can lead to severe anemia, cerebral malaria, pulmonary edema, renal failure and even death, while in the fetus it can cause abortion, premature birth, low birth weight, and fetal death. Elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) is associated with low birth weight and anemia in pregnant women. This study was conducted to measure the levels of TNF- α in plasma and placental tissue, and hemoglobin levels as well as fetal weight to determine the relationship between them in *P. berghei* infected pregnant mice and normal pregnant mice. Seventeen BALB/c mice used in this study were divided into two groups, those were the study group (9 pregnant mice infected with *P. berghei*) and control group (8 pregnant mice not infected with *P. berghei*). Level of TNF- α were measured using Enzyme Linked Immunosorbent assay (R&D Systems, catalog A00B MT). Hemoglobin levels were determined using flowcytometri, whereas fetal weight were performed with Mettler analytical balance AE 50. T-test statistical analysis showed that the levels of TNF- α in plasma and placental tissue in study group were higher than control group ($p=0.000$, $p=0.034$). Hemoglobin levels in the study group were lower than control group ($p=0.025$). Fetal weights were also lower in fetuses of infected mice than fetuses of uninfected mice ($p=0.002$). Pearson correlation test showed increasing plasma levels of TNF- α in infected *P. berghei* pregnant mice were related with the decreasing levels of Hb, ($r=-0.748$; $p=0.020$), whereas levels of placental TNF- α were not associated with hemoglobin level ($p=0.337$). Both plasma and placental levels of TNF- α were not associated with the incidence of fetal low weight ($p=0.380$, and $p=0.365$). It can be concluded that the increased levels of TNF- α is associated with decreased levels of hemoglobin (Hb), but not associated with fetal low weight.

Keywords : *Plasmodium berghei*, *Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α)*, *Hemoglobin*, *Birth Weight*

ABSTRAK

Infeksi *Plasmodium berghei* dapat menyebabkan peningkatan kadar TNF α baik pada plasma maupun pada jaringan plasenta. Peningkatan kadar TNF α tersebut dapat menyebabkan terjadinya anemia pada mencit bunting yang terinfeksi *P. berghei*. Penelitian ini dilakukan untuk mengukur kadar TNF α plasma dan jaringan, kadar hemoglobin dan berat badan lahir pada mencit bunting yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi *P. berghei* dan mengetahui hubungan kadar TNF α plasma dan jaringan dengan kejadian anemia serta dengan kejadian berat badan lahir.

Analisis statistik yang digunakan adalah T-test untuk mengetahui perbedaan kadar TNF α plasma dan jaringan, kadar hemoglobin dan berat badan lahir pada kelompok studi dan kelompok kontrol. Analisis statistik menunjukkan bahwa kadar TNF α pada plasma ($p=0,000$) dan jaringan ($p=0,034$) pada kelompok studi lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Kadar hemoglobin pada kelompok studi lebih rendah ($p=0,025$) daripada kelompok kontrol yang tidak terinfeksi. Berat badan lahir juga lebih rendah ($p=0,001$) pada mencit bunting yang terinfeksi, daripada kelompok kontrol yang tidak terinfeksi.

Hubungan peningkatan kadar TNF α plasma dan jaringan plasenta pada mencit bunting yang diinfeksi *P. berghei* dengan penurunan kadar Hb, menggunakan uji korelasi *Pearson Correlations*, menunjukkan nilai yang bermakna untuk peningkatan kadar TNF α pada plasma terhadap penurunan Hb ($p=0,020$; $r=-0,748$), sedangkan pada jaringan plasenta menunjukkan nilai yang tidak bermakna ($p=0,337$; $r=-0,363$). Sedangkan hubungan antara kadar TNF α plasma dengan berat badan lahir mempunyai nilai yang tidak bermakna ($p=0,380$, $r=-0,334$), demikian pula hubungan antara kadar TNF α jaringan dengan berat badan lahir mempunyai nilai yang tidak bermakna ($p=0,365$, $r=0,344$).

Kata kunci : *Plasmodium berghei*, kadar TNF α , kadar hemoglobin, berat badan lahir

LATAR BELAKANG

Malaria merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting dan merupakan penyakit parasit yang menginfeksi 300-500 juta orang setiap tahunnya (WHO, 2012). Penyakit yang menyerang manusia ini disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium* (DFID, 2010).

Selama bertahun-tahun dikenal ada empat spesies *Plasmodium*, yang dapat menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium falciparum* (*P. Falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. Vivax*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) dan *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) (WHO, 2012). *Plasmodium knowlesi* merupakan spesies yang baru-baru ini dinyatakan dapat menginfeksi manusia. *Plasmodium knowlesi* ditemukan pertama kali pada tahun 1965 menyerang macaca (Singh, 2004).

Malaria pada kehamilan dapat disebabkan oleh keempat spesies *Plasmodium*, sedangkan pada spesies yang kelima belum pernah dilaporkan. *Plasmodium*

falciparum merupakan parasit yang dominan pada ibu hamil dan mempunyai dampak paling berat terhadap morbiditas dan mortalitas ibu dan janinnya (Hinderaker *et al.*, 2002; Erharbor *et al.*, 2010). *Plasmodium falciparum* menjadi penyebab terbanyak anemi pada ibu hamil (Guyatt & Snow, 2001).

Wanita hamil yang tinggal di daerah endemik mudah terinfeksi parasit malaria dibandingkan wanita yang tidak hamil, dan berhubungan dengan risiko *intra uterine growth retardation* (IUGR) persalinan prematur, anemi dan kematian bayi (Anya, 2004; Crawley, 2004; Uneke, 2007; Kevenon, 2010). Infeksi malaria pada wanita hamil sangat mudah terjadi karena adanya perubahan sistim imunitas ibu selama kehamilan, baik imunitas seluler maupun imunitas humoral, serta diduga juga akibat peningkatan hormon kortisol pada wanita selama kehamilan (Desai *et al.*, 2007).

Sitokin yang diduga banyak berperan pada mekanisme patologi malaria adalah

Tumor Necrosis Factor α (TNF α). *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) menginduksi terjadinya perubahan pada netrofil yaitu pelepasan enzim lisosomal, ekspresi reseptor permukaan seperti reseptor Fc dan integrin, adhesi dan migrasi kemotaktik (Costa, 2006). *Tumor Necrosis Factor α* berhubungan dengan bayi lahir berat rendah dan anemi (Rogerson, 2007).

Ibu hamil dengan infeksi malaria selama kehamilannya, dapat menyebabkan anemia, dengan hemoglobin < 11 gr/dl (Erhabor, 2009), melahirkan Bayi Berat Lahir Rendah (BBLR), dengan berat badan bayi < 2500 gram, yang merupakan risiko tinggi terjadinya kematian bayi serta dapat menyebabkan lahir prematur (gestasi < 37 minggu) dan IUGR (Moorman, 1999; Guyatt & Snow, 2004; Rogerson, 2007; Uneke 2007).

Dari permasalahan di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh paparan *P. berghei* pada mencit bunting terhadap kadar TNF α , kadar Hb, berat badan lahir serta hubungan kadar TNF α dengan kadar Hb dan berat badan lahir.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang menggunakan mencit jenis BALB/c betina yang terbagi menjadi kelompok studi sebagai kelompok yang terinfeksi dan kelompok tidak terinfeksi sebagai kelompok kontrol. Parameter yang digunakan adalah kadar TNF α , kadar Hb dan berat badan lahir.

Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Swasta Malang, Laboratorium Biologi, Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sampel Penelitian

1. Mencit bunting terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 30 mencit sebagai kelompok studi.

2. Mencit bunting tidak terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 20 mencit sebagai kelompok kontrol.

Variabel Penelitian

Variabel Independen (bebas)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah infeksi *Plasmodium berghei*.

Variabel Dependen (tergantung)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar TNF α , kadar Hb dan berat badan lahir.

Definisi Operasional

1. *Plasmodium berghei* adalah Plasmodium yang menginfeksi mencit, pada manusia memberi gejala yang sama dengan *P. falciparum*. *Plasmodium berghei* galur Anka ini di dapatkan dari Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya Malang. Plasmodium ini diinfeksi pada mencit galur Balb/c dengan konsentrasi parasit 10^6 dalam 0,2 mL darah secara intraperitoneal. Pemberian *P. berghei* pada mencit bunting dilakukan hari ke 9 kebuntingan.
2. **Kadar TNF** adalah kadar TNF plasma dan pada jaringan plasenta diukur menggunakan Quantikine ELISA (*Enzyme Linked Immuno Assay*) Inc. 2 plate dari R&D Systems, katalog MT A00B. Satuan pq/ml dengan skala data rasio. Kadar TNF diperiksa di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang.
3. **Kadar Hb** adalah parameter status besi yang memberikan suatu ukuran kuantitatif tentang beratnya kekurangan zat besi setelah anemia berkembang. Alat ukurnya *flowcytometri*, satuan g/dl dengan skala data rasio. Pemeriksaan Hb dilakukan di Laboratorium swasta Malang.
4. **Berat Badan Lahir** adalah janin mencit yang lahir pada trimester III (normal berat janin mencit 0,5 – 1,5 gram). Alat ukurnya untuk mengetahui janin mengalami BBLR adalah dengan menimbang berat badan janin mencit dengan neraca analitis Mettler AE 50, di Laboratorium

Parasitologi Universitas Brawijaya Malang. Skala data rasio.

Metode Pengumpulan Data

Untuk mendapatkan data yang valid dan reliabel, maka digunakan metode pengumpulan data mulai pemeliharaan sampai pembedahan mencit yang meliputi :

- a. Pembelian 100 ekor mencit dari Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta, terdiri dari 50 ekor mencit jantan, 50 ekor mencit betina.
- b. Pemisahan mencit, masing-masing 10 ekor mencit/kandang.
- c. Kelompok mencit jantan dan kelompok mencit betina ditempatkan pada ruangan yang berbeda.
- d. Pemberian makan (BR -1 dan kacang hijau), minum pada mencit 2x/hari. Sekam diganti setiap 3 hari.
- e. Pemberian tanda pada mencit bunting untuk masing-masing kelompok.
- f. Penimbangan mencit setiap hari sampai satu hari sebelum dilakukan pembedahan.
- g. Inokulasi *Plasmodium berghei* pada 30 ekor mencit bunting kelompok studi hari ke 9.
- h. Penghitungan derajat parasitemia setiap hari pada mencit bunting kelompok studi yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.
- i. Pembedahan mencit bunting kelompok studi yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan kelompok kontrol yang tidak diinfeksi *Plasmodium berghei* pada hari ke 19.

Teknik Analisis Data

Uji beda

Uji t dua variabel, digunakan untuk membandingkan atau membedakan dua variabel serta untuk menguji generalisasi dari hasil analisis. Teknik ini digunakan antara :

1. Kadar TNF α plasma kelompok studi (diinfeksi) dan kelompok kontrol (tanpa infeksi).

2. Kadar TNF α jaringan kelompok studi (diinfeksi) dan kelompok kontrol (tanpa infeksi).
3. Kadar Hb kelompok studi (diinfeksi) dan kelompok kontrol (tanpa diinfeksi).
4. Berat badan lahir kelompok studi (diinfeksi) dan kelompok kontrol (tanpa infeksi).

Uji korelasi

Uji korelasi *Pearson Correlations* dipergunakan untuk mencari hubungan atau untuk menguji signifikansi hipotesis asosiatif bila masing-masing variabel yang dihubungkan berbentuk ordinal dan sampelnya kecil. Teknik ini digunakan antara :

1. Hubungan kadar TNF α plasma dengan kadar Hb pada kelompok studi.
2. Hubungan kadar TNF α jaringan dengan kadar Hb pada kelompok studi.
3. Hubungan kadar TNF α plasma dengan berat badan lahir pada kelompok studi
4. Hubungan kadar TNF α jaringan dengan berat badan lahir pada kelompok studi.

Prosedur Kerja Penelitian

Prosedur pembuntingan mencit

Pembuntingan mencit betina sebanyak 50 ekor dilakukan setelah persiapan sinkronisasi estrus melalui tiga tahap, yaitu *Leeboot effect*, *Pheromon effect* dan *Whiten effect* (Sardjono, 2005), dengan cara mencit betina dikandangan dengan sesama mencit betina selama 10 hari dan dipisahkan ruangan dari kandang mencit jantan. Pada saat ini mencit akan berada dalam kondisi un-estrus (*Leeboot effect*). Mencit betina yang sudah dipisahkan akan memulai siklus birahinya dengan dipapar urin mencit jantan yang terdapat pada sekam selama 3 hari (*Pheromon effect*). Mencit betina akan mengalami birahi pada malam ke tiga setelah pemaparan urin mencit jantan dengan mendekatkan kandang mencit

jantan ke kandang mencit betina (*Whiten effect*). Kemudian mencit jantan dan mencit betina digabungkan dalam satu kandang selama satu malam dengan ratio 1:1. Hari pertama kebuntingan adalah hari pertama setelah perkawinan.

Mencit yang digunakan adalah mencit galur Balb/c yang berusia antara 13-15 minggu, berat badan antara 20-30 gram. *P. berghei* digunakan untuk menginfeksi hewan coba.

Inokulasi *P. berghei* pada mencit donor

Inokulasi *P. berghei* pada mencit donor diberikan secara intraperitoneal, setelah 4 hari inokulasi, setiap hari dilakukan penghitungan parasitemia. Penghitungan parasitemia dibuat dari sediaan hapusan darah tipis yang diambil dari ujung ekor dan dibuat dengan pewarnaan *Giemsa*. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop pembesaran 100x. Jika parasitemia mencit donor sudah > 12%, berarti mencit donor sudah siap digunakan sebagai donor infeksi mencit studi.

Inokulasi mencit studi

Inokulasi mencit studi dilakukan pada hari ke 9 kebuntingan sebanyak 10^6 parasit dalam 0,2 mL darah untuk tiap mencit studi secara intraperitoneal.

Pengukuran jumlah parasitemia mencit studi

Pengukuran jumlah parasitemia mencit studi dilakukan setiap hari dengan membuat hapusan darah tipis yang diambil dari ekor mencit, darah diteteskan pada *object glass*, dikeringkan kemudian ditetesi *methanol* hingga merata, setelah kering hapusan dicat dengan *Giemsa*. Didiamkan selama 30 menit, kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Jumlah parasitemia dihitung per 1000 eritrosit dengan pembesaran mikroskop 100x. Jumlah parasitemia mencit studi dihitung setiap hari sampai dengan menjelang pembedahan pada hari ke 19 kebuntingan.

Pembedahan

Pembedahan dilakukan pada hari ke 19 kebuntingan. Pembedahan dilakukan pada mencit studi dan mencit kontrol yang

bunting. Mencit dimasukkan dalam wadah yang sudah diberi kloroform, ditunggu sampai mencit benar-benar mati, kemudian dibedah untuk diambil darah, janin dan plasentanya. Pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar Hb dan kadar TNF α , pengambilan janin dan plasenta untuk pemeriksaan TNF α pada jaringan serta untuk mengetahui adanya Berat Badan Lahir Rendah (BBLR). Darah dimasukkan dalam *vacutainer*, disentrifuse dan disimpan dalam lemari pendingin, janin disimpan dalam cairan formalin, sedangkan plasenta dimasukkan dalam tabung dan disimpan dalam lemari pendingin.

Prosedur Pemeriksaan TNF α dengan ELISA Kit

Prosedur Pemeriksaan TNF α pada plasma dengan ELISA Kit

Pemeriksaan TNF α pada plasma dilakukan dengan metode *ELISA Mouse TNF α Immunoassay Catalog Number MTA 00B*. Pertama dipersiapkan *reagen, sample* dan *standard dilutions* serta *well/microplate* untuk masing-masing preparat. Kemudian dilakukan persiapan preparasi Standard pada *Mouse TNF α standard* dengan ditambahkan 1 ml *deionized water*, disentrifuse kemudian didiamkan selama 5 menit. Untuk preparasi *Control Mouse TNF α Kit Control*, ditambahkan 1,0 ml *deionized water*, kemudian disentrifuse. Disiapkan *microplate* untuk *sample* dan membuat sederetan larutan standard. Kemudian memasukkan 50 μ l *Assay diluents* RD 1-63 ke semua *well*. Setelah itu ditambahkan 50 μ l Standard, Control dan sampel ke masing-masing *well*, kemudian diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang. Sambil menunggu inkubasi, disiapkan wash buffer $1x \rightarrow 1/25 \times 50 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$. Setelah diinkubasi selama 2 jam, dilakukan *washing* sebanyak 5x. Setelah *washing*, dimasukkan 100 μ l *Mouse TNF α Conjugate* ke masing-masing *well*, kemudian diinkubasi lagi selama 2 jam dalam suhu ruang. Setelah inkubasi, dilakukan *washing* kembali sebanyak 5x. Setelah inkubasi 2 jam yang kedua, dimasukkan 100 μ l *Substrat*, kemudian

diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang, dan dihindarkan dari cahaya. Setelah inkubasi, ditambahkan 100 μ l *Stop Solution* dan dimixing. Kemudian hasil dibaca dengan *ELISA Reader* 150nm, *correction* 540 nm/570 nm.

Prosedur Pemeriksaan TNF α pada jaringan plasenta dengan ELISA Kit

Sebelum jaringan plasenta diperiksa dengan teknik ELISA, jaringan plasenta harus dihomogenizer dulu di Laboratorium Biokimia. Pertama dibuat larutan TBS (*Trizma Base Solution*) dari Trizma Base 50 mM, Na Cl 0,2 M dan aquades 1000mL dengan Ph 7,4. Kemudian ditimbang Trizma Base dan Na CL sesuai kebutuhan, dimasukkan dalam tabung valcon 50 cc, ditambahkan aquades 20 mL. Kemudian disentrifuse dan diukur pHnya, kalau Ph masih tinggi ditambahkan HCL, disentrifuse lagi sampai pH mencapai 7,4. Selanjutnya diambil TBS 10 mL, 0,05 Triton X dan 1 tablet protease, disentrifuse sampai larut dan tercampur sempurna. Jaringan plasenta yang akan digerus dipersiapkan. Tiga jaringan plasenta, 1mL TBS, 0,05 Triton X dan 1 tablet protease dimasukkan dalam appendof. Hasil gerusan dibawa ke Laboratorium Biokimia untuk disonikasi dengan alat sonikator panjang frekuensi 400 Hz, selama 10 menit supaya jaringan homogen. Hasil sonikasi dibawa ke Laboratorium Biomedik, selanjutnya disentrifuse untuk persiapan pemeriksaan TNF α pada jaringan plasenta dengan teknik ELISA. Selanjutnya prosedur pemeriksaan TNF α pada jaringan plasenta teknik ELISA sama dengan pemeriksaan TNF α pada plasma.

HASIL PENELITIAN

Hasil Pembuntingan Mencit

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, mulai bulan Desember 2012 sampai dengan bulan April 2013. Penelitian dimulai dengan pemeliharaan mencit, pembuntingan mencit, inokulasi mencit bunting kelompok studi

dengan *Plasmodium berghei* pada hari ke 9 kebuntingan dan pembedahan mencit yang dilakukan pada hari ke 18 kebuntingan.

Mencit yang digunakan adalah mencit galur Balb/C yang didapat dari Universitas Gajah Mada Yogyakarta sebanyak 100 ekor mencit, terdiri dari 50 ekor mencit betina yang belum pernah bunting dan 50 ekor mencit jantan. Tiga puluh ekor mencit betina dipersiapkan untuk pembuntingan dan diinfeksi *Plasmodium berghei* atau sebagai kelompok perlakuan dan 20 ekor mencit dipersiapkan untuk pembuntingan tanpa diinfeksi *Plasmodium berghei* sebagai kelompok kontrol. Dari 30 ekor mencit yang dipersiapkan sebagai kelompok perlakuan, ada 8 ekor mencit yang berhasil bunting, sedangkan dari 20 ekor mencit dipersiapkan untuk kelompok kontrol hanya 2 ekor yang mengalami kebuntingan. Sejak kebuntingan hari pertama, setiap hari dilakukan penimbangan berat badan dan pada hari ke 9 kebuntingan, mencit bunting kelompok perlakuan diinfeksi *Plasmodium berghei*. Penghitungan derajat parasitemia pada mencit bunting kelompok perlakuan dilakukan setiap hari. Pada hari ke 16 dan 17 kebuntingan, 2 ekor mencit kelompok perlakuan mengalami perdarahan pervaginam yang berlanjut kematian sehingga mencit kelompok perlakuan tinggal 6 ekor. Pembedahan mencit kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan pada hari ke 18 kebuntingan. Pada pembedahan dilakukan pengambilan darah dari jantung untuk pemeriksaan kadar Hb dan kadar TNF α plasma, dan pengambilan jaringan plasenta dan janin untuk pemeriksaan kadar TNF α jaringan plasenta dan penimbangan janin.

Untuk melengkapi jumlah sampel pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dilakukan pembuntingan kedua pada mencit yang tidak berhasil bunting pada pembuntingan pertama (40 ekor) dan akhirnya didapatkan 9 ekor mencit berhasil bunting yang kemudian dikelompokkan 3 ekor untuk kelompok perlakuan dan 6 ekor untuk kelompok kontrol sehingga akhirnya

pada penelitian ini jumlah sampel pada kelompok perlakuan ada 9 ekor dan jumlah sampel pada kelompok kontrol ada 8 ekor.

Kadar TNF α pada plasma

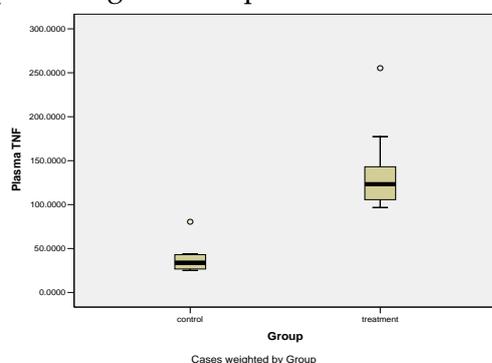
Hasil laboratorium pemeriksaan kadar TNF α dengan teknik ELISA pada plasma kelompok studi dan kelompok kontrol dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Kadar TNF α plasma pada kelompok studi dan kelompok kontrol dengan uji T

No	Variabel	Mean		p-value
		KS	KK	
1	Rata-rata kadar TNF α plasma	137,1706	39,0524	0,000

Karena nilai $p=0,000$, maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan kadar TNF α plasma antara kelompok studi dengan kelompok kontrol, dimana kadar TNF α plasma pada kelompok studi lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Data kadar TNF α plasma pada kelompok studi dan kelompok kontrol dapat dilihat pada diagram boxspot berikut :



Gambar 5.1 Data kadar TNF α plasma pada kelompok studi dan kelompok kontrol menggunakan boxspot. Sebaran data antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna diantara kedua kelompok. Pada kelompok perlakuan, rentang data lebar dan median diatas / lebih besar dari nilai kelompok kontrol.

Kadar TNF α pada jaringan plasenta

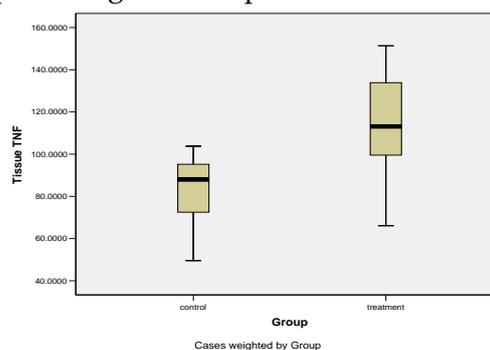
Hasil pemeriksaan kadar TNF α dengan teknik ELISA pada jaringan plasenta dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Kadar TNF α jaringan pada kelompok studi dan kelompok kontrol dengan uji T

No	Variabel	Mean		p-value
		KS	KK	
1	Rata-rata kadar TNF α jaringan	111,2361	83,0988	0,034

Karena nilai $p=0,034$, maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan kadar TNF α jaringan antara kelompok studi dengan kelompok kontrol, dimana kadar TNF α jaringan pada kelompok studi lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Data kadar TNF α jaringan pada kelompok studi dan kelompok kontrol dapat dilihat pada diagram boxspot berikut :



Gambar 5.2 Data kadar TNF α jaringan pada kelompok studi dan kelompok kontrol menggunakan boxspot. Sebaran data antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna diantara kedua kelompok. Pada kelompok perlakuan, rentang data lebar dan median diatas / lebih besar dari nilai kelompok kontrol.

Kadar Hemoglobin pada Mencit Bunting yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*.

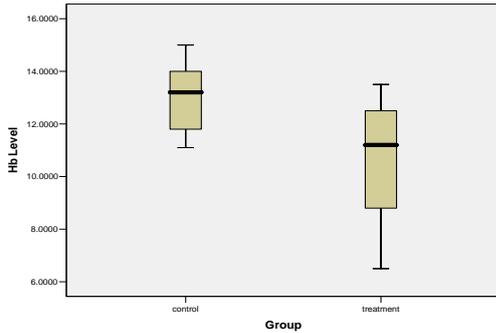
Hasil pemeriksaan Hemoglobin (Hb) dapat dilihat pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Kadar Hb pada kelompok studi dan kelompok kontrol dengan uji T

No	Variabel	Mean		p-value
		KS	KK	
1	Rata-rata kadar Hb	10,6889	13,0125	0,025

Karena nilai $p=0,025$, maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan kadar Hb antara kelompok studi dengan kelompok kontrol, dimana kadar Hb pada kelompok studi lebih rendah daripada kelompok kontrol.

Data kadar Hb pada kelompok studi dan kelompok kontrol dapat dilihat pada diagram boxspot berikut :



Gambar 5.3 Data kadar Hb pada kelompok studi dan kelompok kontrol menggunakan boxspot. Sebaran data antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna diantara kedua kelompok. Pada kelompok perlakuan, rentang data lebih kecil dan median diatas / lebih kecil dari nilai kelompok kontrol.

Berat Badan Lahir

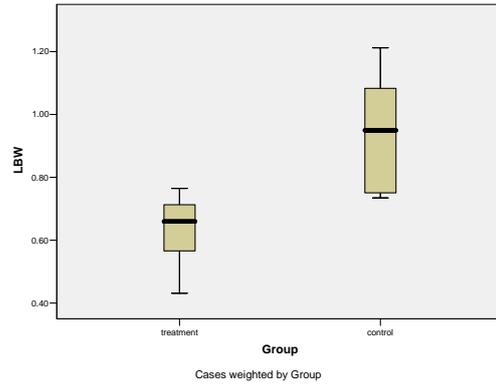
Hasil berat badan lahir dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.4 Berat badan lahir pada kelompok studi dan kelompok kontrol dengan uji T

No	Variabel	Mean		P-value
		KS	KK	
1	Rata-rata berat badan lahir	0,6299	0,9392	0,001

Karena nilai $p=0,001$, maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan berat badan lahir antara kelompok studi dengan kelompok kontrol, dimana berat badan lahir pada kelompok studi lebih rendah daripada kelompok kontrol.

Data berat badan lahir pada kelompok studi dan kelompok kontrol dapat dilihat pada diagram boxspot berikut :

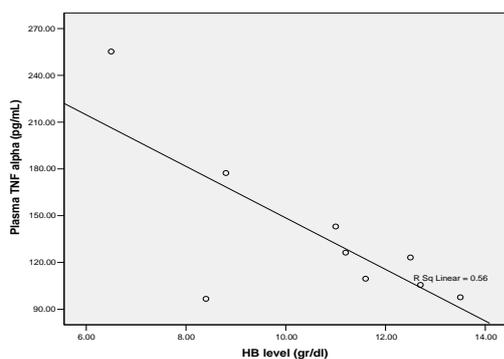


Gambar 5.4 Data berat badan lahir pada kelompok studi dan kelompok kontrol menggunakan boxspot. Sebaran data antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna diantara kedua kelompok. Pada kelompok perlakuan, rentang data lebih kecil dan median diatas / lebih kecil dari nilai kelompok kontrol.

Hubungan antara kadar TNF-α plasma dan plasenta dengan Berat Badan Lahir dan kadar Hb

Dari data hasil penelitian yang dianalisis dengan *Pearson Correlations* dengan memakai nilai kepercayaan $p = 0,05$, maka hubungan antara kadar TNF-α plasma dengan Berat Badan Lahir Rendah memiliki nilai yang tidak bermakna ($p=0,380$; $r=-0,334$), begitu pula hubungan antara kadar TNF-α jaringan dengan Berat Badan Lahir Rendah memiliki nilai yang tidak bermakna ($p=0,365$; $r=0,344$).

Sebaliknya hubungan antara kadar TNF-α plasma dengan kadar hemoglobin (Hb) mempunyai nilai yang bermakna ($p=0,020$; $r=-0,748$).



Gambar 5.5 Korelasi TNF plasma dengan kadar Hb. Sebaran data menunjukkan semakin tinggi kadar TNF- α plasma, maka semakin rendah kadar Hb.

Hubungan antara kadar Hb dengan Berat Badan Lahir

Dari data hasil penelitian yang dianalisis dengan *Pearson Correlations* dengan memakai nilai kepercayaan $p = 0,05$, maka hubungan antara kadar Hb dengan Berat Badan Lahir Rendah memiliki nilai yang tidak bermakna ($p=0,774; r=0,112$).

PEMBAHASAN

Peningkatan kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α)

Peningkatan kadar TNF- α plasma dan jaringan plasenta pada mencit bunting yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dibuktikan dengan nilai yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol (tabel 5.1 dan tabel 5.2). Analisis hasil statistik menggunakan uji beda dengan T test, menunjukkan bahwa infeksi *Plasmodium berghei* dapat menyebabkan peningkatan kadar TNF α baik pada plasma maupun pada jaringan plasenta ($p=0.000; p=0.034$).

Peningkatan kadar TNF- α terjadi pada manusia yang terkena infeksi, termasuk pada manusia yang terkena infeksi malaria, tanpa terkecuali terlebih pada wanita hamil. Selama infeksi malaria, Interferon gamma (IFN- γ) yang dihasilkan oleh sel limfosit yang teraktivasi akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan TNF- α . *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) adalah suatu sitokin yang bersifat pirogen, multifungsi yang

diproduksi oleh makrofag, sel T, sel B dan sel mast, yang terlibat dalam *immunoprotection* terhadap infeksi, tetapi juga berperan dalam peradangan, autoimun dan patofisiologi banyak penyakit (Rogerson *et al.*, 2003^c; Poovassery, 2009). Pada kadar rendah, dapat menghambat pertumbuhan stadium darah parasit dengan mengaktifkan sistem imun seluler, dan juga dapat membunuh parasit secara langsung namun aktifitasnya lemah. Tetapi pada kadar berlebihan, yang merupakan tanggapan terhadap hiperparasitemia dan pertumbuhan parasit yang berlebihan, akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, 2008).

Selama tahap infeksi malaria, TNF- α dikaitkan dengan splenomegali, penurunan berat badan, dan anemia. Pada manusia, TNF- α berlebihan dikaitkan dengan malaria serebral dan demam malaria, sedangkan rasio TNF- α dalam plasma dikaitkan dengan anemia pada anak-anak (Abrams, 2005).

Wanita hamil, terutama primigravida, lebih rentan terhadap infeksi malaria (Achidi, 2005). Selama kehamilan terkait malaria (*Placental Associated Malaria*) terjadi adhesi eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* pada sinsitiotrofoblas menyebabkan adanya parasit dalam ruang intervili. Hal ini disebabkan karena parasit yang terinfeksi parasit melekat khusus pada *Chondroitin Sulfat-A* (CSA) yang diekspresikan pada sinsitiotrofoblas. Perlekatan *P.falciparum* di plasenta menyebabkan ketidakseimbangan respon imun dengan peningkatan jenis sitokin Th1 seperti IFN- γ dan TNF- α (Irawati, 2008), yang menjelaskan mengapa immunomodulation lebih penting di plasenta daripada dalam darah perifer (Suguitan *et al.*, 2004; Diouf *et al.*, 2007).

Pada wanita hamil yang menderita malaria terdapat kenaikan TNF- α , IL-1 dan IL-8 yang sangat nyata pada jaringan plasenta dibandingkan wanita hamil yang tidak menderita malaria. Sitokin-sitokin tersebut terutama dihasilkan oleh makrofag

akibat induksi hemozoin yang terdapat di plasenta (Baratawidjaja & Rengganis, 2009).

Penurunan Kadar Hemoglobin (Hb)

Menurut definisi WHO, anemi pada kehamilan pada manusia adalah ringan bila kadar hemoglobin (Hb) 10,0-10,9g/dl, sedang bila 8,0-9,9 g/dl dan berat bila < 8g/dl (Achidi *et al.*, 2005; Ouma *et al.*, 2007; Taseer, 2011; Getachew, 2012). Kriteria anemi pada mencit jika kadar hemoglobin (Hb) < 14g/dl (Rahardjo, 2011; Koponska, 2012).

Penurunan kadar Hb pada mencit bunting yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dibuktikan dengan nilai yang lebih tinggi, dapat dilihat pada tabel 5.3 dan tabel 5.4. Analisis hasil statistik menggunakan uji beda dengan T test, menunjukkan bahwa infeksi *Plasmodium berghei* dapat menyebabkan penurunan kadar Hb ($p=0,025$). Penurunan kadar Hb dapat menyebabkan anemi, anemi dapat terjadi pada ibu hamil dengan infeksi malaria. Infeksi malaria akan menyebabkan lisis sel darah merah yang mengandung parasit sehingga akan menyebabkan anemi (Rogerson *et al.*, 2003^b; Rogerson SJ. 2007^b).

Luasnya kerusakan eritrosit tergantung pada lama dan beratnya infeksi. Hemolisis sering mengarah pada peningkatan bilirubin serum dan pada malaria falciparum dapat sedemikian parahnya sehingga menimbulkan hemoglobinuria (*Black Water Fever*). Pada setiap infeksi malaria, derajat anemia disebabkan oleh penghancuran sel-sel oleh parasit. Perubahan-perubahan otogenik pada eritrosit oleh parasit kemungkinan menimbulkan hemolisis dan peningkatan flagilitas osmotis terjadi dalam semua eritrosit baik yang terinfeksi maupun tidak. Hemolisis juga dapat ditimbulkan oleh primakuin pada penderita dengan defisiensi Glukosa-6 fosfat dehidrogenase herediter (Ouma, 2007).

Plasmodium vivax dapat meningkatkan kelainan hematologi berat seperti anemia dan trombositopenia, serta keguguran dan kelahiran prematur. Anemia berat dan trombositopenia yang disebabkan oleh *P.*

vivax atau infeksi *P. falciparum* dapat menyebabkan diatesis perdarahan yang disebabkan oleh hemolisis, pengurangan deformitas eritrosit, peningkatan *splenic clearance*, serta pengurangan dan penurunan kelangsungan hidup platelet (Rodriguez, 2006).

Gregor (1984) mendapatkan data bahwa penurunan kadar Hb dalam darah hubungannya dengan parasitemia, terbesar terjadi pada primigravida yang terinfeksi malaria dan berkurang sesuai dengan penyusutan peningkatan paritas.

Hubungan Peningkatan kadar TNF α dengan penurunan kadar Hb.

Hubungan Peningkatan kadar TNF α plasma dan jaringan plasenta pada mencit bunting yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dengan penurunan kadar Hb dapat dilihat pada tabel 5.5. Analisis hasil statistik menggunakan uji korelasi dengan *Pearson Correlations*, menunjukkan nilai yang bermakna untuk peningkatan kadar TNF α pada plasma terhadap penurunan Hb ($p=0,020$; $r=-0,748$), sedangkan pada jaringan plasenta analisis hasil statistik menggunakan uji korelasi dengan *Pearson Correlations*, menunjukkan nilai yang tidak bermakna ($p=0,337$; $r=-0,363$).

Pada daerah endemis malaria, infeksi malaria selama kehamilan merupakan sumber kedua dari anemia ibu, hal ini karena infeksi malaria dapat meningkatkan penghancuran sel darah merah dan penurunan eritropoiesis. Efek ini dapat dimediasi sebagian oleh peningkatan pada sitokin proinflamasi seperti TNF- α , yang terkait dengan anemia ibu hamil yang terinfeksi malaria (Abrams, 2005 ; Rogerson, 2007^b; Clark, 2006).

Hubungan antara Peningkatan kadar TNF α dengan Berat Badan Lahir

Hubungan peningkatan kadar TNF α pada plasma dan pada jaringan plasenta yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan Berat Badan Lahir dapat dilihat pada tabel 5.5.

Pada hasil penelitian, data berat janin dapat dilihat pada tabel 5.4, yang menunjukkan bahwa mencit bunting yang terinfeksi *Plasmodium berghei* mempunyai berat janin < 1 gram. Analisis statistik menggunakan uji korelasi dengan *Pearson Correlations*, menunjukkan bahwa hubungan antara kadar TNF α plasma dengan berat badan lahir mempunyai nilai yang tidak bermakna ($p=0,380$, $r=-0,334$), demikian pula hubungan antara kadar TNF α jaringan dengan berat badan lahir mempunyai nilai yang tidak bermakna ($p=0,365$, $r=0,344$). Hal ini terjadi mungkin karena imunologi yang prima pada janin, seperti beberapa peneliti melaporkan bahwa janin menghasilkan proinflamasi sitokin setelah ibu terpapar antigen malaria (Abrams, 2005).

Pada malaria plasenta, TNF- α dikaitkan dengan respon inflamasi lokal dan berat badan lahir rendah (Poovassery. 2009). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa peningkatan ekspresi sitokin plasenta seperti *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleukin 8, g-interferon, IL-6 dan IL-10 terjadi di kehamilan dengan malaria, namun hanya TNF- α yang terkait dengan BBLR (Rogerson *et al.*, 2003; Ayoola *et al.*, 2012).

Dalam studi yang berhubungan dengan perubahan sitokin plasenta yang merugikan kehamilan, telah ditemukan hubungan antara kadar TNF- α dan berat bayi lahir rendah, termasuk berat bayi lahir rendah yang disebabkan oleh terhambatnya pertumbuhan janin dan kelahiran prematur. Peningkatan kadar TNF- α berhubungan dengan abortus spontan tetapi mekanismenya belum bisa dijelaskan. Tingginya kadar TNF- α dikaitkan dengan terhambatnya pertumbuhan janin dan kelahiran prematur, terhambatnya pertumbuhan janin akibat dari infeksi kronis, sedangkan kelahiran prematur dikaitkan dengan tingginya parasitemi pada plasenta (Fried, 1998; Rogerson, 2007^a).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit bunting dapat menyebabkan peningkatan kadar TNF α .
2. Infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit bunting dapat menyebabkan penurunan kadar Hb.
3. Terdapat hubungan antara peningkatan kadar TNF α dan penurunan kadar Hb pada mencit bunting yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.
4. Tidak terdapat hubungan antara peningkatan kadar TNF α dengan Berat Badan Lahir pada mencit bunting yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

7.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah jumlah sample yang digunakan sebaiknya bisa lebih banyak, agar data dapat lebih mudah dianalisis dengan analisis statistik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrams ET. 2005. *Malaria During Pregnancy and Foetal Haemological Status in Blantyre Malawi*. *Malaria Journal*.4(39):1-8
- Achidi EA, Kuoh AJ, Minang JT. *Et al.* 2005. *Malaria Infection in Pregnancy and Its Effects on Hemoglobin Levels in Women from a Malaria Endemic Area of Feko Division South West Province, Cameroon*. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 25(3):235-240
- Achmad DS. 2000. *Ilmu Gizi dan Profesi*. Jilid I. Jakarta, Dian Rakyat
- Anya SE. 2004. *Seasonal Variation in the Risk and Causes of Maternal Death in The Gambia Malaria Appears to be an Important Factor*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 70(5):510-513
- Ayoola OO, Whatmore A, Balogun WO, Jarret OO, Cruickshank JK, Clayton PE. 2012. *Maternal malaria status and metabolic profiles in pregnancy and in cord*

- blood : relationships with birth size in Nigerian infants. *Malaria Journal*. **11**:75
- Baratawidjaja KG, Rengganis I. 2009. *Imunologi Dasar Edisi 8*. Jakarta. FK UI
- Crawley J. 2004. *Reducing the Burden of Anemia in Infants and Young Children in Malaria Endemic Countries of Africa. : From Evidence to Action*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **71**(Suppl 2):25-34
- Depkes RI. 2008 . *Pedoman Pengendalian Kasus Malaria di Indonesia*. Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan
- Desai M, Kuilo FO, Nosten F. 2007. *Epidemiology and Burden of Malaria in Pregnancy*. **7**(93-104)
- Diouf I, Fievet N, Doucoure S, et al. 2007. *IL-12 producing monocytes and IFN- γ and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by Plasmodium falciparum*. *Journal of Reproductive Immunology*. **74**:152-162
- Erhabor O, Adias TC, Hart ML. 2010. *Effects of Falciparum Malaria on the Indices of Anemia among Pregnant Women in the Niger De ta of Nigeria*. *Journal of Clinical Medicine and Research*. **2**(3):35-41
- Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. 1998. *Malaria Elicits type 1 Cytokines in the Human Placental IFN- γ and TNF- α associated with Pregnancy Outcomes*. *The Journal of Immunology*. **160**:2523-30
- Getachew M, Yewhalaw D, Tafess K, Getachew Y, Zeynudin A. 2012. *Anemia and associated risk factors among pregnant women in Gilgel Gibe dam area, Southwest Ethiopia*. *Parasites and Vectors*. **5**:296
- Guyatt HL, Snow RW. 2001. *The Epidemiology and Burden Plasmodium falciparum Related Anemi Among Pregnant Woman in Sub Sahara Africa*. *Am. J Trop. Med Hyg* **64**(1,2):36-44
- Hindraker SG, Isen BEO, Lie RT, et al. 2002. *Anemia in Pregnancy in Rural Tanzania : Associations with Micronutrients Status and Infections*. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**, 192-199
- Irawati L, Acang N, Irawati N. 2008. *Ekspresi Tumor Necrosis Factor-Alfa (TNF- α) dan Inter Leukin-10(IL-10) pada Infeksi Malaria Falciparum*. *Majalah Kedokteran Andalas*. **1**(32)
- Kevenon, et all. 2010. *Elevated Levels of Soluble TNF Receptors 1 and 2 Correlate with P. falciparum Parasitemia in Pregnant Women Potensial Markers for Malaria Associated Inflammation*. *The Journal of Immunology*, **185**:7115 - 7122
- Moormann, et all. 1999. *Malaria and Pregnancy : Placental Cytokine Expression and Its Relationship to Intrauterine Growth Retardation*. *The Journal of Infection Diseases*, **180**:1987-93
- Ouma P, Van Eijk AM, Hamel MJ. et al. 2007. *Malaria and Anemia among pregnant women at first antenatal clinic visit in Kisumu, western Kenya*. *Tropical Medicine and International Health*. **12**(12):1515-1523
- Poovassery J, Sarr D, Smith G, Nagy T, Moore JM. 2009. *MalariaInduced Murine Pregnancy Failure : Distinct Roles For IFN- γ And TNF*. *J. Immunol*. 2009. **183**(8):5342-5349
- Rodriguez AJ, et al. 2006. *Short Report : Pregnancy Outcomes Associated with Plasmodium Vivax Malaria in Northeastern Venezuela*. *Am J. Trop. Med. Hyg*. **74**(5):755-757
- Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW. 2007^a. *Malaria in Pregnancy : Pathogenesis and Immunity*. *Lancet Infect Dis*. **7**:105-17
- Rogerson SJ. 2007^b. *Malaria in Pregnancy : Linking immunity and Pathogenesis to prevention*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **77**(6):14-22
- Rogerson SJ, Mkundika P, Kanjala MK. 2003^a. *Diagnosis of Plasmodium falciparum Malaria at Delivery: Comparison of Blood Film Preparation Methods and of Blood Films with Histology*. *J. Clin. Microbiol*. **41**(4):1370-1374
- Rogerson SJ, Dollina E, Getachew A, et al. 2003^b. *Placental Monocyte Infiltrates in*

- Respons to Plasmodium falciparum Malaria Infection and Their Association With Adverse Pregnancy Outcomes.* Am. J. Trop. Hyg, **68**(1):115-119
- Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, *et al.* 2003. *Placental Tumor Necrosis Factor Alpha but Not Gamma Interferon Is Associated With Placental Malaria and Low Birth Weight in Malawian Women.* Infection and Immunity, **71**(1):267-270
- Singh B, Lee, Asmad, *et al.* 2004. *A Large Focus of Naturally Acquired Plasmodium knowlesi Infections in Human Being.* The Lancet Vol. 363(1017-1024)
- Singh N, Shukla MM, Sharma VP. 1999. *Epidemiology of Malaria in Pregnancy in Central India.* Bulletin of World Health Organization. **77**(7)
- Suguitan AL, Gowda DC, Fouda G, *et al.* 2004. *Lack of an Association between Antibodies to Plasmodium falciparum Glycosylphosphatidylinositols and Malaria-Associated Placental Changes in Cameroonian Women with Preterm and Full-Term Deliveries.* Infection and Immunity. **72**(9):5267-5273\
- Taseer IH, Safdar S, Mirbahar A, Awan Zara. 2011. *Anemia in pregnancy ; Related Risk Factors in under developed area.* Professional Med J. **18**(1):1-4
- Uneke CJ. 2007. *Impact of Placental Plasmodium falsiparum Malaria Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub Saharan Africa.* Yale J.Biomol. Med. **80**(3):95-103