

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Annona muricata*

2.1.1 Kandungan Ekstrak

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae-Plants</i>
<i>Subkingdom</i>	: <i>Tracheobionta – Vascular plants</i>
<i>Superdivision</i>	: <i>Spermatophyta – Seed plants</i>
<i>Division</i>	: <i>Magnoliophyta – Flowering plants</i>
<i>Class</i>	: <i>Magnoliopsida – Dicotyledons</i>
<i>Subclass</i>	: <i>Magnoliidae</i>
<i>Order</i>	: <i>Magnoliales</i>
<i>Family</i>	: <i>Annonaceae – Custard-apple family</i>
<i>Genus</i>	: <i>Annona L. – annona</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Annona muricata L. – Soursoup</i> ¹⁴

Ekstrak daun *A. muricata* mengandung berbagai macam senyawa antara lain: *alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid, coumarins, lactone, anthraquinon, tannin, cardiac glycoside, phenol, phytosterol, acetogenin*.^{15,16}

2.1.2 *Annona muricata* sebagai Antiplasmodium

Efek antiplasmodium *A. muricata* telah terbukti pada hari ke- 3 pasca inokulasi PbA tetapi hal ini tidak teramati pada hari ke- 5 dan 7 pasca inokulasi.¹⁰ Penelitian mengenai pemberian ekstrak daun sirsak secara *in vitro* pada *P. falciparum* menunjukkan potensi *acetogenin* sebagai antiplasmodium. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *A. muricata* menurunkan tingkat parasitemia dari 13,2% menjadi 10,26% pada hari terakhir.¹⁰

Ekstrak *hexane ethil acetat* dan MeOH dari daun *A. muricata* memperlihatkan level baik hingga sedang dari aktivitas antiplasmodial melawan *P. falciparum* strain F32 sensitif klorokuin tetapi tidak untuk strain W2 resisten klorokuin.¹⁷ *Ethil acetat* yang paling kuat dari tanaman *A. muricata* perlu dipertimbangkan efek toksiknya karena terbukti toksik terhadap sel U-937 monosit manusia. Ekstraksi yang berbeda ternyata tidak hanya menunjukkan aktivitas antiplasmodium yang menjanjikan dari ekstrak daun *A. muricata* (ekstrak DCM, MeOH, H₂O) tetapi juga aktivitas non toksik dari ekstrak untuk sel MDBK.¹⁸

2.1.3 *Annona muricata* sebagai Antioksidan

Efek antioksidan *A. muricata* menunjukkan bahwa ekstrak air dari daun mempunyai kadar total fenol dua kali lebih tinggi dibanding *ethanol* daun *A. muricata*. Selain itu *A. muricata* mengandung antioksidan kuat yang membuat tanaman ini efisien dalam menangani penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif.¹⁵ Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadinya ketidakseimbangan antara ROS dengan kapasitas antioksidan untuk mencegah terjadinya komplikasi oksidatif.¹⁹ *Reactive oxygen species* (ROS) merupakan salah satu kelompok radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada biomolekul lipid melalui peroksidasi lipid.²⁰ Kadar *Nitrite Oxide* (NO) yang tinggi akan membunuh parasit yang akan berkembang menjadi MS.²¹ NO dapat menurunkan derajat parasitemia pada mencit yang diinfeksi Pb.²² Penelitian lain menyebutkan bahwa *A. muricata* dapat meningkatkan kadar NO pada mencit *Swiss* yang telah diinfeksi PbA.²³ Ekstrak *ethanol* daun sirsak mengandung

senyawa *flavonoid* dari golongan *flavonol*.²⁴ Penelitian lain menyebutkan bahwa *flavonoid* jenis *flavonol* dapat menjadi imunostimulan karena mampu meningkatkan produksi IL-2.²⁵ Pemberian ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan secara bermakna kadar IL-10 pada mencit *Swiss* yang diinokulasi PbA.⁸ Ekstrak daun sirsak (*A. muricata*) dapat meningkatkan jumlah sel T, CD4⁺ dan CD8⁺ pada timus secara signifikan.²⁶ Ekstrak *ethanol* daun sirsak dosis 25, 50, 100 mg/kgBB belum menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel B220 (CD45R).²⁷

2.1.4 Penggunaan di Masyarakat

A. muricata yang biasanya dikonsumsi masyarakat dalam bentuk kapsul. Satu kapsul pada umumnya mengandung 400 mg ekstrak *A. muricata folium* atau setara dengan 2gr daun sirsak kering.²⁸ Untuk pencegahan diminum 3x1 kapsul sehari, sedangkan untuk pengobatan diminum 3x2 kapsul sehari. Satu botol berisi 50 kapsul dengan harga berkisar Rp 35.000,00 sampai dengan Rp 65.000,00. Diminum karena dipercaya memiliki efek antiparasit, antioksidan, anti-inflamasi, immunosupresan.^{16,28,29,30}

1.2 Artemisinin - based Combination Therapy (ACT)

ACT adalah kombinasi turunan *artemisinin* dengan antimalaria yang bekerja lebih lambat dan mempunyai aksi yang berbeda.¹¹ Derivat *artemisinin* merupakan obat baru yang berasal dari Cina (Qinghaosu) yang memberikan efektivitas yang

tinggi terhadap strain yang multi resisten. *Artemisinin* mempunyai kemampuan farmakologi sebagai berikut.

1. Mempunyai daya bunuh parasit yang cepat dan menetap.
2. Efektif terhadap parasit yang resisten.
3. Memberikan perbaikan klinis yang cepat.
4. Menurunkan gametosit.
5. Bekerja pada semua bentuk parasit baik pada bentuk trophozoit dan skizon maupun bentuk-bentuk lain.
6. Untuk pemakaian monoterapi perlu lama pengobatan 7 hari.²

Artemisinin juga menghambat metabolisme parasit lebih cepat dari obat antimalaria lainnya.² *Artemisinin* dan analog – analognya cepat diserap dengan kadar plasma puncak terjadi dalam 1-2 jam dan waktu paruh 1-3 jam setelah pemberian oral. *Artemisinin*, *artesunate*, *artemether* cepat dimetabolisasi menjadi metabolit aktif *dihydroartemisinin*. *Artemisinin* dan analognya merupakan skizonosida darah yang sangat cepat terhadap semua parasit malaria manusia. *Artemisinin* tidak berefek pada stadium hati. Aktivitas antimalaria *artemisinin* mungkin timbul dari produksi radikal bebas yang terbentuk setelah pemutusan jembatan endoperoksida *artemisinin* yang dikatalis oleh besi di vakuol makanan parasit atau dari inhibisi kalsium ATPase parasit.³¹

ACT yang direkomendasikan oleh WHO ada lima yaitu *artemether* dan *lumefantrine* (AL), *artesunate* dan *amodiaquine* (AAQ), *artesunate* dan *mefloquine* (ASM), DHP, *artesunate* dan *sulfadoxine – pyrimethamine* (AS+SP).¹¹ ACT yang digunakan di Indonesia ada tiga kombinasi yaitu AAQ,

AL, DHP.³² Penelitian lain menyebutkan bahwa *artemisinin* dan *naphoquine* (AN) dan DHP sangat efektif, aman dan mentolerir perawatan untuk setiap malaria dan kedua obat ini menjanjikan untuk terapi baris pertama kebijakan di Indonesia.¹² Selain itu penelitian lain melaporkan bahwa DHP lebih efektif dan lebih toleran dibandingkan dengan *artesunate-amodiaquine* (AAQ) dalam melawan resistensi obat *P. falciparum* dan *P. vivax*.¹³

1.2.1 Dihydroartemisinin – Piperaquine (DHP)

Dihydroartemisinin adalah metabolit aktif dari *artesunate* dan *artemether*.¹¹ Selain dapat diberikan peroral *dihydroartemisinin* juga dapat diberikan secara perrektal.³³ Mekanisme kerja dari *dihydroartemisinin* belum diketahui secara jelas.¹¹ *Piperaquine* adalah sebuah senyawa *bisquinoline* dari kelompok *aminoquinoline* dari obat anti malaria termasuk klorokuin. Cara kerja *piperaquine* menyerupai klorokuin, dimana terjadi akumulasi pada vakuola makanan parasit dan menghambat detoksifikasi hem oleh parasit yang selanjutnya mengakibatkan tumpukan hem kompleks yang bersifat toksik.¹¹

Piperaquine juga efektif melawan parasit malaria yang resisten terhadap klorokuin. Pada strain resisten klorokuin itu memuntahkan klorokuin dari vakuola makanan parasit, karena klorokuin dikeluarkan lagi oleh vakuola makanan sehingga tidak ada akumulasi klorokuin dari vakuola di tempat yang seharusnya bekerja melakukan hambatan detoksifikasi terhadap hem. Apabila terjadi penumpukan hem maka akan toksik.¹¹

Jika digunakan *piperaquine* masih cukup manjur karena parasit akan bermutasi sehingga tidak dimuntahkan lagi, maka *piperaquine* akan terakumulasi

dan menghambat detoksifikasi hem. Hal ini terjadi karena kerja dari senyawa *bisquinoline* yang terkandung dalam *piperaquine*.¹¹

DHP mudah diabsorpsi dengan cepat oleh saluran pencernaan puncak plasma setelah 1 sampai 3 jam untuk *dihydroartemisinin* dan 3 – 6 jam untuk *piperaquine*. *Piperaquine* didistribusikan secara luas ke seluruh tubuh dengan lebih dari 99% terikat pada protein plasma. *Dihydroartemisinin* memiliki volume distribusi yang lebih kecil dan 44 sampai 93% terikat pada protein plasma. Eliminasi *dihydroartemisinin* jauh lebih cepat dari pada *piperaquine* (*dihydroartemisinin* paruh waktu sekitar 1 jam, *piperaquine* 2 – 4 minggu).¹¹ Beberapa studi melaporkan hasil efikasi kombinasi DHP kombinasi (cure rate 28 hari > 95%) dan regimen tidak berhubungan dengan sifat kardi toksik dan efek samping yang lain.³³

Fixed dose combination (FDC) satu tablet mengandung 40 mg *dihydroartemisinin* dan 320 mg *piperaquine*. Obat ini diberikan peroral selama tiga hari dengan dosis tunggal harian 2-4 mg/kgBB *dihydroartemisinin* dan 16-32 mg/kgBB *piperaquine*.³³

2.3 Pemilihan Mencit *Swiss* dalam Penelitian

Keunggulan mencit *swiss* adalah:

- a. Cukup sensitif terhadap infeksi PbA.
- b. Survivalnya relatif lebih lama dibanding mencit lain pasca inokulasi PbA walaupun tidak diobati.
- c. Mudah dipelihara dan ditenakkan.³⁴

2.4 *Plasmodium berghei* ANKA

2.4.1 Taksonomi *Plasmodium berghei* ANKA

<i>Superkingdom</i>	: Eukaryota
<i>Superphylum</i>	: Alveolata
<i>Phylum</i>	: Apicomplexa
<i>Class</i>	: Aconoidasida
<i>Order</i>	: Haemosporida
<i>Family</i>	: Plasmodiidae
<i>Genus</i>	: Plasmodium
<i>Subgenus</i>	: Plasmodium (Vinckeia)
<i>Species</i>	: Plasmodium berghei ³⁵

P. berghei adalah spesies malaria *murine* yang awalnya diisolasi dari tikus belukar di Afrika Tengah.³⁶ Infeksi *P.berghei* adalah model yang banyak digunakan sebagai alat yang ampuh untuk studi genetik dan patogenesis terbalik.³⁷ *P. berghei* adalah *hemoprotozoa* yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia kecil. Dasar biologi *Plasmodium* yang menyerang rodensia sama dengan *Plasmodium* yang menyerang manusia seperti siklus hidup maupun morfologinya, genetik dan pengaturan genomnya, fungsi dan struktur pada kandidat vaksin antigen target sama.³⁸

2.4.2 Siklus Hidup *Plasmodium berghei*

Sporozoit sebelum menuju ke hepatosit dapat bermigrasi ke berbagai sel di dalam tubuh pejamu dalam bentuk parasitoporus vakuola. Sporozoit di hati akan berkembang dalam waktu 47 - 52 jam membentuk matur skizon yang berisi 1500

- 8000 merozoit per matur skizon, namun tidak ditemukan bukti untuk stadium hipnozoit. Setelah ruptur hepatosit, merozoit ini keluar ke peredaran darah. Pada saat mencapai stadium eritrositer, merozoit berkembang menjadi tropozoit dengan perubahan peningkatan ukuran sel dan sitoplasma. Tropozoit mengkonsumsi Hb dari sel darah merah sehingga memproduksi *brown hemozoin* yang dapat terlihat granula-granula pigmen di dalam sitoplasma. Perkembangan merozoit sampai matur tropozoit memerlukan waktu 16 jam. Skizogoni memerlukan waktu 68 jam, parasit mengalami pembelahan nukleus sehingga membentuk sel inisial dengan 6 sampai 24 inti. Menjelang akhir skizogoni, parasit mengalami pembelahan dalam sitoplasmanya. Skizon matur dalam eritrosit mengandung 8 – 12 merozoit. Sedangkan skizon dalam retikulosit mengandung 16 – 18 merozoit. Pada skizon yang sudah matur pigmen menjadi lebih kompak dan bulat menyerupai bentuk merozoit pada parasit manusia. Protein merozoit yang menginvasi eritrosit hampir serupa dengan parasit manusia yaitu MSP1, MSP4/5, AMA1, MAEBL, RhopH3 dan SUB2. Imatur dan matur skizon akan menghilang dari peredaran darah tepi akan tersebar dalam organ dalam seperti limpa dan paru.³⁹

Walaupun *P.berghei* merupakan model dari *P. falciparum* tetapi semua stadium dapat ditemukan di darah tepi. Merozoit dari skizon hati dapat langsung berubah mengalami gametosit setelah menginvasi eritrosit.³⁹

2.5 Limfoblas Limpa Mencit

2.5.1 Peranan Limpa pada Malaria

Limpa merupakan organ limfoid terbesar pada tubuh dibungkus oleh kapsul jaringan ikat kolagen.⁵ Limpa terdiri atas zona sel T (senter germinal) dan zona sel B (zona folikel). Limpa merupakan tempat respon imun utama yang merupakan saringan terhadap antigen asal darah.⁴⁰ Limpa berfungsi sebagai menyaring darah, memproduksi sel limfoid, mengeliminasi atau menginaktivasi antigen yang berasal dari darah, menghancurkan keping darah dan eritrosit yang menua, dan berperan dalam hemopoiesis.⁵

Limpa sebagai tempat terbentuknya sel darah sehingga banyak ditemukan retikulosit. Kebanyakan PbA lebih menginvasi retikulosit, namun bila ketersediaan retikulosit sedikit maka PbA memiliki kemampuan beralih menginvasi sel normosit. Jika retikulosit tersedia lagi maka PbA akan berpindah lagi menginvasi retikulosit. Selain itu skizon pada PbA tidak ditemukan dalam peredaran darah namun banyak ditemukan di kapiler organ dalam seperti limpa.⁴⁰ Skizon tersebut difagosit oleh sel makrofag dan limfosit pada limpa yang menyebabkan peradangan sel sehingga terjadi *splenomegaly*.^{5,6} Ruptur limpa dapat terjadi secara spontan atau karena trauma. Biasanya mulai dengan hematoma subkapsular yang diikuti perobekan kapsular.⁴¹

2.5.2 Limfoblas Limpa Mencit

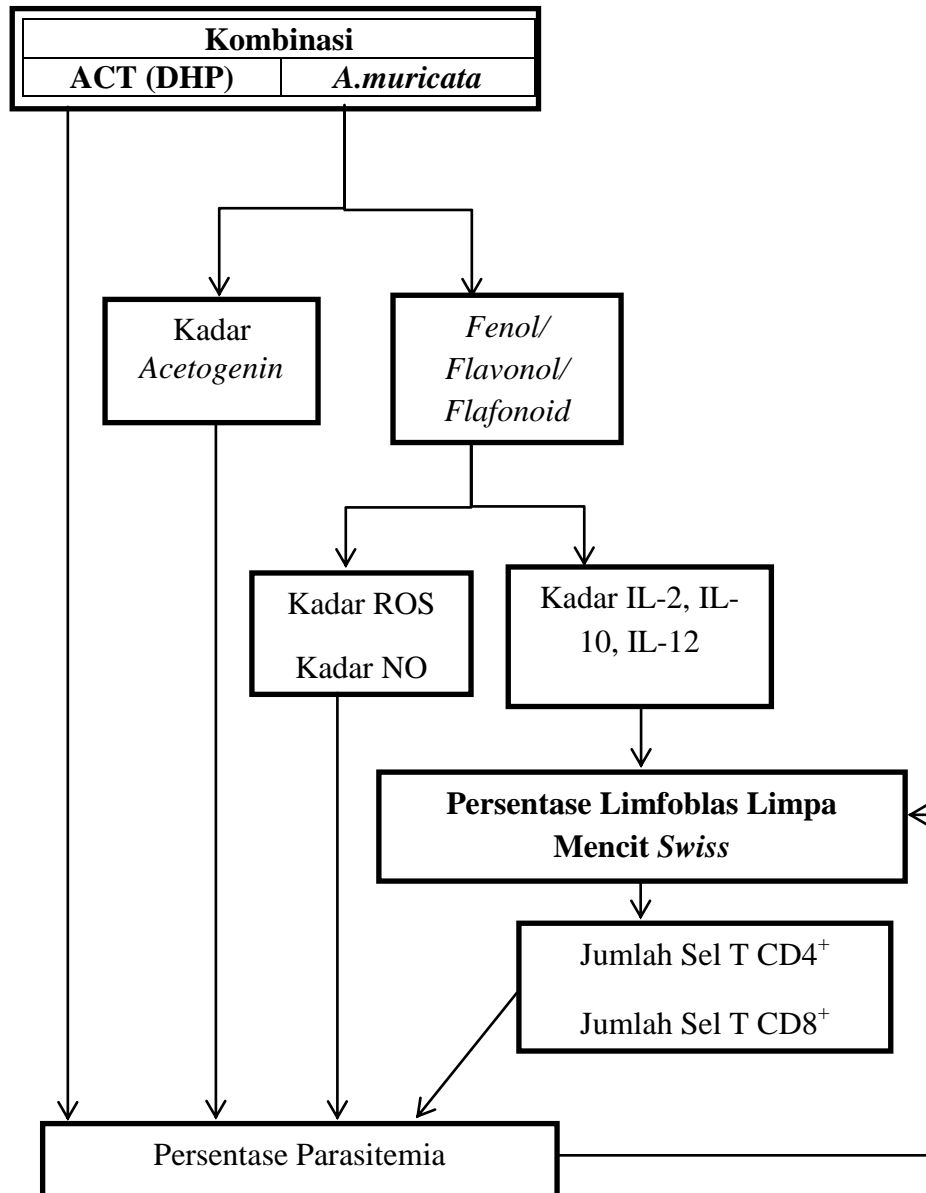
Limfoblas adalah limfosit yang secara morfologis imatur, yang dahulu dianggap menggambarkan stadium awal dalam perkembangan limfosit, tetapi

sekarang dikenal sebagai limfosit teraktivasi yang telah berubah sebagai respon terhadap rangsangan antigenik.⁷ Limfosit merupakan sel agranulosit yang mencakup urutan kedua terbesar dalam jumlah dari jenis populasi sel darah putih. Limfosit digolongkan menjadi tiga kategori fungsional yaitu limfosit B (sel B), limfosit T (sel T), sel null. Fungsi sel B berperan dalam sistem imun humoral sedangkan sel T berperan dalam sistem imun seluler.⁵

Sel B yang berasal dari limpa dan KGB kurang lebih 1/3 dari tubuh. Sel B diproduksi pertama selama fase embrionik dan berlangsung terus selama hidup. Perkembangan sel B mulai dari sel prekursor limfoid yang berdiferensiasi menjadi sel progenitor B (pro-sel B) yang mengekspresikan *trans membran tirosin-fostase* (CD45R). Sel B yang diaktifkan dapat berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi dan mensekresi antibodi atau sel B memori. Aktivasi sel B akibat proses transduksi sinyal yang dipacu oleh ikatan dengan reseptor sel B yang akhirnya menimbulkan banyak perubahan dalam sel antara lain perubahan ekspresi gen spesifik. Sedangkan sel T yang non aktif disirkulasikan melalui KGB dan limpa yang dikonsentrasikan dalam folikel dan zona marginal sekitar folikel. Sel T terdiri atas sel CD4⁺, CD8⁺, sel T naïf, NKT dan Tr/Treg/Ts/Th3.⁷ Sel T naïf yang terpajan dengan kompleks antigen MHC dan dipresentasikan APC atau rangsangan sitokin spesifik yang akan berkembang menjadi subset sel T berupa CD4⁺, CD8⁺. Sel naïf yang terpajan dengan antigen berkembang menjadi sel Th0 yang selanjutnya menjadi sel efektor Th1 yang berperan infeksi dan Th2 berperan pada alergi. IL-12 yang dilepas makrofag dan SD menginduksi perkembangan Th1 melalui jalur STAT4 dependen, IL-4 yang terutama diproduksi sel T sendiri

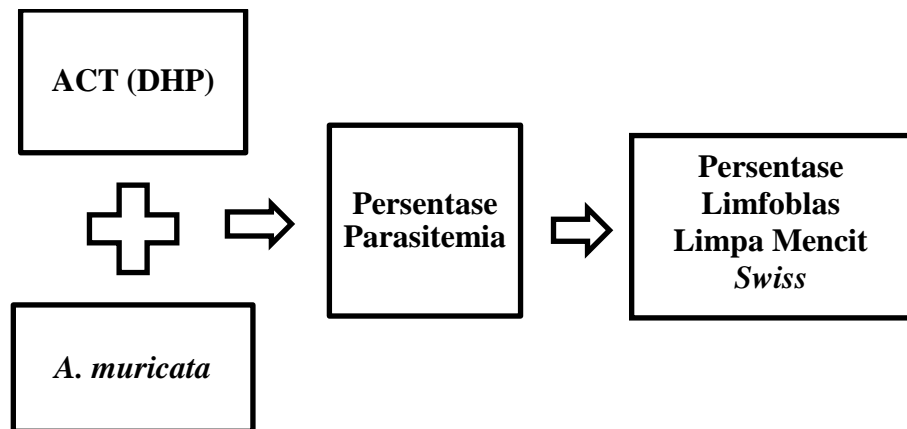
dan meningkatkan induksi Th2 dengan jalur *STAT6 dependent*. Faktor transkripsi T-bet sebagai respon terhadap IFN- γ meningkatkan respons Th1. Atas pengaruh sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan antigen Th0 akan berkembang menjadi sel Th2 yang merangsang sel B untuk meningkatkan produksi antibody. IL-2 adalah faktor pertumbuhan untuk sel T yang dirangsang antigen dan berperan pada ekspansi klon sel T setelah antigen dikenal. IL-2 merangsang proliferasi dan diferensiasi sel T, sel B, dan NK. IL-2 juga mencegah respons imun terhadap antigen sendiri melalui peningkatan apoptosis sel T melalui Fas dan merangsang aktivitas sel T regulatori.⁴⁰

2.6 Kerangka Teori



Gambar 2.1. Kerangka Teori

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.2. Kerangka Konsep

2.8 Hipotesis

2.8.1 Hipotesis Umum

Terdapat pengaruh kombinasi *A. muricata* dengan ACT terhadap persentase limfoblas limpa yang terinfeksi malaria.

2.8.2 Hipotesis Khusus

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

3. Persentase limfoblas lebih rendah kelompok yang diberi ekstrak air daun *A. muricata* dan obat ACT dibanding kelompok yang diberi ekstrak air daun *A. muricata* pre dan pasca inokulasi PbA.