

DOI: <http://dx.doi.org/10.33846/sf13nk327>

Efektivitas Ekstrak Daun *Azadirachta indica* Terhadap Kadar Interleukin-10 pada Mencit Swiss yang Diinokulasi *Plasmodium Berghei* ANKA

Ainun Najib

Program Studi D4 Teknologi Laboratorium Medik, STIKES Banyuwangi; ainun.annaim@gmail.com

RA Kisdjiamiatun RMD

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; kisdjiamiatun@gmail.com

Tria Anisa Firmanti

Program Studi D3 Keperawatan, STIKES Banyuwangi; triaanisafirmanti01@gmail.com (koresponden)

ABSTRACT

Malaria is a health problem for the world's population in tropical and subtropical regions. Malaria infection is caused by the protozoa Plasmodium spp. This study aims to determine the effectiveness of Azadirachta indica leaf extract on interleukin-10 levels in Swiss mice inoculated with Plasmodium berghei ANKA (PbA). This study used a post-test only design with control group which used 24 Swiss mice weighing 30-35 grams as subjects and divided into 4 groups (K, T1, T2, T3); all groups were inoculated with PbA. Group T1 (inoculated with PbA and treated with Azadirachta indica at a dose of 0.25 mg/gBW), Group T2 (inoculated with PbA and treated with Azadirachta indica at a dose of 0.5 mg/grBW), Group T3 (inoculated with PbA and treated with Azadirachta indica with a dose of 1 mg/gBB). Data analysis used Anova + posthoc test. The results showed that there were differences in IL-10 levels, both in the control group and in the treatment group after being given treatment with a p value <0.05. A greater increase in IL-10 levels occurred in the T3 group (mean +158.6 pg/ml) compared to the K group (mean +73.4 pg/ml), the T1 group (mean +143.2 pg/ml), and the T2 group (mean +136.7 pg/ml).

Keywords: *Azadirachta indica* extract; interleukin-10; *Plasmodium berghei* ANKA

ABSTRAK

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan bagi penduduk dunia yang berada di kawasan tropis maupun subtropis. Infeksi malaria disebabkan oleh protozoa *Plasmodium spp.* Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun *Azadirachta indica* terhadap kadar interleukin-10 pada mencit Swiss yang diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Penelitian ini menggunakan rancangan *post-test only with control group* yang menggunakan subjek mencit Swiss dengan berat 30-35 gram sebanyak 24 ekor dan dibagi menjadi 4 kelompok (K, T1, T2, T3); semua kelompok diinokulasi PbA. Kelompok T1 (diinokulasi PbA dan terapi *Azadirachta indica* dengan dosis 0,25 mg/gBB), Kelompok T2 (diinokulasi PbA dan terapi *Azadirachta indica* dengan dosis 0,5 mg/grBB), Kelompok T3 (diinokulasi PbA dan terapi *Azadirachta indica* dengan dosis 1 mg/gBB). Analisis data menggunakan uji Anova + *posthoc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan kadar IL-10, baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan setelah diberikan *treatment* dengan nilai $p < 0,05$. Peningkatan kadar IL-10 yang lebih besar terjadi pada kelompok T3 (rerata $\pm 158,6$ pg/ml) dibandingkan kelompok K (rerata $\pm 73,4$ pg/ml), kelompok T1 (rerata $\pm 143,2$ pg/ml), dan kelompok T2 (rerata $\pm 136,7$ pg/ml).

Kata kunci: ekstrak *Azadirachta indica*; interleukin-10; *Plasmodium berghei* ANKA

PENDAHULUAN

Plasmodium Sp. merupakan kelompok protozoa yang menyebabkan penyakit menular malaria. Penyakit ini ditularkan melalui salifa dari gigitan nyamuk *anopheles* betina. ⁽¹⁾ Pada laporan secara global pada *world malaria report* 2019 menyatakan bahwa terdapat sekitar 228 juta kasus malaria dengan jumlah kematian sebanyak 405.000 yang disebabkan oleh malaria. Prevalensi kasus pada tahun 2018 yaitu sebanyak 93% di Afrika, 2,1% di Mediterania dan 3,4% di Asia Tenggara. ⁽²⁾ Sedangkan di Indonesia, terdapat sekitar 33% yang tergolong endemic rendah (172 kota/kabupaten), 7% yang tergolong endemic sedang (37 kota/kabupaten), dan 8% endemic tinggi (247 kota/ kabupaten) yang terdapat di daerah Papua Barat, Papua dan NTT. ⁽²⁻⁴⁾

Selama infeksi malaria, eritrosit yang terinfeksi dan mengandung skizont matur akan mengalami lisis dan mengeluarkan ribuan merozoit, hemozoin, serta GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*). GPI merupakan senyawa toksin yang dihasilkan oleh merozoit dan berperan sebagai *Phatogen Associated Molecular Pattern* (PAMP). Interaksi antara GPI dengan TLR (*Toll like Receptor*) mengaktifkan sel *T-Helper* (Th) yang memicu sekresi dari TNF- α . Sel Th-2 juga akan teraktivasi sehingga mensekresi *Interleukin-10* (IL-10) untuk mengimbangi produksi TNF- α untuk melawan infeksi malaria. ⁽⁵⁾ Sitokin yang disekresi oleh sel Th-1 akan menanggulangi terjadinya infeksi malaria dengan cara mempengaruhi fungsi fagositosis dari makrofag. sebaliknya sitokin yang diproduksi oleh TNF- α akan mengaktifkan fungsi fagositosis dari makrofag dalam memberantas eritrosit yang terinfeksi serta parasite yang rusak didalam darah. ⁽⁶⁾ Produksi sitokin pro-inflamasi (TNF- α) oleh sel Th-1 akan dihambat oleh IL-10. ⁽⁷⁾ Produksi TNF- α yang optimal akan memicu pemberantasan parasite sehingga tingkat parasitemia menurun. Sedangkan produksi TNF- α yang berlebihan akan berisiko memicu terjadinya komplikasi malaria serebral, dan tingginya produksi IL-10 juga akan memberikan perlindungan akibat kadar TNF- α yang berlebih. ^(8,9) Keseimbangan antara sitokin Th-2 (IL-10) dan sitokin Th-1 (TNF- α), memiliki peran yang sangat penting dalam proses keparahan infeksi malaria. Sitokin tipe 1 (TNF- α) memiliki peran yang penting dalam mengontrol diawal terjadinya infeksi, namun juga perlu adanya keseimbangan renpons dari sitokin tipe 2 (IL-10). Sitokin IL-10 akan menekan produksi dari TNF- α , juga berfungsi dalam mengurangi presentasi antigen serta menetralkan

patologi dari makrofag. ⁽⁹⁻¹¹⁾ Upaya untuk memberantas malaria telah banyak dilakukan namun prevalensinya masih tinggi karena resistensi plasmodium terhadap obat yang sudah ada. ^(12,13)

Obat anti malaria merupakan salah satu kunci dalam pemberantasan dan pengendalian malaria. ⁽¹⁴⁾ Terapi kombinasi artemisinin (*artemisinin combination therapy-ACT*) telah direkomendasikan oleh WHO dan telah dilaksanakan sejak tahun 2004 untuk pengobatan utama pada malaria. Saat ini obat antimalarial telah mengalami resistensi, kecuali artemisinin. Jika resistensi juga terjadi pada artemisinin, maka pengobatan terhadap malaria tidak akan bisa terselesaikan. Penelitian yang menggunakan kombinasi artemisinin dengan tanaman ekstrak yang mengandung senyawa Flavonoid memberikan hasil yang lebih efektif dalam mengobati dan menurunkan jumlah parasitemia. Hal ini membuktikan tanaman ekstrak yang mengandung Flavonoid dapat dijadikan sebagai obat pendamping utama dalam pengobatan malaria. ⁽¹⁵⁾ Penelitian ini bermaksud menganalisis kadar IL-10 pada mencit Swiss yang diinokulasi *plasmodium berghei* ANKA yang diberi perlakuan Ekstrak Daun *Azadirachta indica*

METODE

Jenis studi laboratorium experimental pada penelitian ini menggunakan desain *true experimental design* in vivo, dengan rancangan *post-test onlu control group design*. Percobaan dilakukan pada mencit strain swiss dengan berat 30-35 gram sebanyak 24 ekor. Penentuan sampel pada penelitian ini telah sesuai dengan standar WHO (*Word Healts Organization*) yaitu berdasarkan uji coba *research guidelines for evaluating the savety and efficacy of herbal medicine* dengan menggunakan 5 (lima) ekor mencit strain Swiss pada setiap kelompok. Sebelum diberlakukan treatment pada semua kelompok diinokulasi dengan *plasmodium berghei* ANKA (2×10^7 PbA). Mencit strain Swiss yang digunakan dalam penelitian ini berumur 8 minggu.

Dalam penelitian ini digolongkan menjadi 4 (empat) kelompok yaitu (K), kelompok kontrol negatif adalah mencit yang diinokulasi PbA tanpa pemberian ekstrak *Azadirachta indica*. (T1), mencit yang diinokulasi PbA dengan pemberian ekstrak *Azadirachta indica* dengan dosis 0,25 mg/grBB. (T2), kelompok mencit yang diinokulasi PbA dengan pemberian ekstrak *Azadirachta indica* dengan dosis 0,5 mg/grBB. (T3), Kelompok mencit yang diinokulasi PbA dengan pemberian ekstrak *Azadirachta indica* dengan dosis 1 mg/grBB.

Pemeriksaan ekspresi sitokin IL-10 limpa diukur dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA) dengan satuan pg/ml menggunakan (Mouse IL-10 Elisa Kit). Data hasil pemberian ekstrak *Azadirachta indica*, kadar sitokin IL-10 dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk mean + (standar deviasi) dengan CI (*convidence Interval*) 95%. Jika hasil data bernilai atau berdistribusi norma maka dilanjutkan dengan Uji bivariate menggunakan *paired sampel T test* sedangkan untuk melihat perbedaan kadar sitokin IL-10 pada kelompok K (kontrol negatif), T1, T2, dan T3 setelah diberikan perlakuan. Selain itu, juga dilakukan Uji *One Way ANNOVA* untuk melihat perbedaan sitokin IL-10 antar kelompok dan dilanjutkan analisis *post hoc LCD*.

HASIL

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nilai rerata kadar IL-10 pada kelompok K (kontrol Negatif) yaitu + 73,4 pg/ml. setelah diberikan Ekstrak Daun *Azadirachta indica* dosis 0,25 mg/grBB nilai rerata kadar IL-10 meningkat menjadi +143,2 pg/ml dengan $p=0,0006$. Kelompok T2 memiliki nilai rerata +136,7 pg/ml lebih tinggi dibanding kelompok K dengan $p=0,0000$. Sedangkan pada kelompok T3 memiliki rerata 158,6 pg/ml juga mengalami peningkatan dibanding kelompok K dengan $p=0,002$. Jadi antara kelompok T1, T2 dan T3 dibandingkan dengan kelompok K memiliki hasil pengukuran kada IL-10 berbeda dengan $p=0,002$.

Tabel 1. Rerata perbedaan kadar IL-10 pada setiap kelompok

No	Kelompok sampel	Kadar IL-10 (pg/ml) mean $\pm$ SD	Nilai p
1.	Kelompok K (diinokulasi PbA tanpa terapi)	73,4 $\pm$ 15,5	0,022 ^a
2.	Kelompok T1 (diinokulasi PbA dan terapi <i>Azadirachta indica</i> dengan dosis 0,25 mg/grBB)	143,2 $\pm$ 40,0*	0,011 ^a
3.	Kelompok T2 (diinokulasi PbA dan terapi <i>Azadirachta indica</i> dengan dosis 0,5 mg/grBB)	136,7 $\pm$ 45,8*	0,025 ^a
4.	Kelompok T3 (diinokulasi PbA dan terapi <i>Azadirachta indica</i> dengan dosis 1 mg/grBB)	158,6 $\pm$ 30,0*	0,006 ^a
	Nilai p	0,002 ^b	

*ANOVA; ^aRepaited Anova; ^bOne way Anova disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ SD

PEMBAHASAN

Rerata kadar IL-10 pada kelompok T1, T2, dan T3 mengalami peningkatan dibandingkan dengan rerata kelompok K, ini membuktikan bahwa infeksi malaria oleh *plasmodium berghei* ANKA pada mencit Swiss ternyata mampu meningkatkan kadar IL-10 Limpa. IL-10 merupakan salah satu regulator penting pada infeksi malaria akut atau malaria serebral yang memiliki fungsi mengontrol respon imun pada model ekperimental malaria atau malaria pada manusia. ⁽¹⁶⁾ Analisis data dengan menggunakan uji *Post Hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok K dengan kelompok T1, T2, dan T3 ($p=0,002$). Eritrosit yang terinfeksi dan mengandung skizont matur akan mengalami lisis dan mengeluarkan ribuan merozoit, hemozoin, serta GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*). GPI merupakan senyawa toksin yang dihasilkan oleh merozoit dan memiliki peran sebagai *Phatogen Associated Molecular Pattern* (PAMP). Interaksi antara GPI dengan TLR (*Toll like Receptor*) akan mengaktifkan sel *T-Helper* (Th) yang memicu peningkatan sekresi dari TNF- α . Sel Th-2 juga akan teraktivasi sehingga mensekresi Interleukin-10 (IL-10) untuk mengimbangi produksi TNF- α untuk melawan infeksi malaria. ⁽⁵⁾ Sitokin yang disekresi oleh sel Th-1 akan menanggulangi terjadinya infeksi malaria dengan cara mempengaruhi fungsi fagositosis dari makrofag. sebaliknya sitokin yang diproduksi oleh TNF- α akan

mengaktifkan fungsi fagositosis dari makrofag dalam memberantas eritrosit yang terinfeksi serta parasite yang rusak didalam darah. ⁽⁶⁾ Produksi sitokin pro-inflamasi (TNF- α) oleh sel Th-1 akan dihambat oleh IL-10. ^(7,17)

Produksi TNF- α yang optimal pada infeksi malaria akan memicu pemberantasan parasite sehingga tingkat parasitemia menurun. Sedangkan produksi TNF- α yang berlebihan akan berisiko memicu terjadinya komplikasi malaria serebral, dan tingginya produksi IL-10 juga akan memberikan perlindungan akibat kadar TNF- α yang berlebih. ^(8,9,18) Keseimbangan antara sitokin Th-2 (IL-10) dan sitokin Th-1 (TNF- α), memiliki peran yang sangat penting dalam proses keparahan infeksi malaria. Sitokin tipe 1 (TNF- α) memiliki peran yang penting dalam mengontrol diawal terjadinya infeksi, namun juga perlu adanya keseimbangan respon dari sitokin tipe 2 (IL-10). Sitokin IL-10 akan menekan produksi dari TNF- α , juga berfungsi dalam mengurangi presentasi antigen serta menetralkan patologi dari makrofag. ⁽⁹⁻¹¹⁾

Pemberian terapi *Azadirachta indica* dapat meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi yaitu IL-10, sehingga menghambat keparahan dari malaria serebral. Berdasarkan uraian diatas peneliti berasumsi ekstrak daun *Azadirachta indica* dapat dijadikan terapi komplementer atau terapi pendamping dalam pengobatan ataupun penanganan malaria karena mampu meningkatkan kadar IL-10 yang berperan sebagai anti-inflamasi sehingga dapat menekan reaksi inflamasi pada malaria serebral.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat disimpulkan pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dapat meningkatkan kadar sitokin IL-10 pada limpa mencit Swiss yang diinokulasi oleh *Plasmodium berghei* ANKA. Peningkatan kadar IL-10 sangat terlihat pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kadar sitokin pro-inflamasi maupun anti-inflamasi yang lain dan mengurai keterkaitan antara sitokin dan sel imunitas spesifik pada pemberian ekstrak daun *Azadirachta indica* sebagai obat pendamping bersama ACT.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gusra T, Irawati N, Sulastri D. Gambaran Penyakit Malaria di Puskesmas Tarusan dan Puskesmas Balai Selasa Kabupaten Pesisir Selatan periode Januari - Maret 2013. J Kesehat Andalas. 2014;3(2):234-7.
2. Kementerian kesehatan RI. Tata laksana kasus malaria. 2018;4.
3. Hasyim H, Nursafingi A, Haque U, Montag D, Groneberg DA, Dhimal M, et al. Spatial modelling of malaria cases associated with environmental factors in South Sumatra, Indonesia. Malar J. 2018;17(1):1-15.
4. Pava Z, Noviyanti R, Handayani I, Trimarsanto H, Trianty L, Burdam FH, et al. Genetic micro-epidemiology of malaria in Papua Indonesia: Extensive *P. vivax* diversity and a distinct subpopulation of asymptomatic *P. falciparum* infections. PLoS One. 2017;12(5):1-13.
5. Sulistyawati SW, Basuki S, Dachlan YP. Ekspresi mRNA Interleukin-10 (IL-10) dalam Kaitannya dengan Patogenesis Malaria Berat Pada Mencit Strain BALB/C yang Diinfeksi Plasmodium yoelli 17XL. J Biosains Pascasarj. 2018;20(3):170.
6. Irawati L. Hubungan Tumor Necrosis Factor-Alfa (Tnf-A) dengan Kadar Hemoglobin dan Parasitemia pada Infeksi Malaria Falciparum. J Kesehat Andalas. 2014;3(2):98-101.
7. Niikura M, Inoue SI, Kobayashi F. Role of interleukin-10 in malaria: Focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. J Biomed Biotechnol. 2011;2011.
8. Shmarina G V., Pukhalsky AL, Kokarovtseva SN, Pukhalskaya DA, Shabalova LA, Kapranov NI, et al. Tumor necrosis factor- α /interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children. Mediators Inflamm. 2001;10(4):191-7.
9. May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)- β ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. J Infect Dis. 2000;182(5):1570-3.
10. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The role of IL-10 in malaria: A double edged sword. Front Immunol. 2019;10(FEB):1-10.
11. Liu Y, Chen Y, Li Z, Han Y, Sun Y, Wang Q, et al. Role of IL-10-producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in *Plasmodium berghei* infected mice. Eur J Immunol. 2013;43(11):2907-18.
12. Silver KL, Zhong K, Leke RGF, Taylor DW, Kain KC. Dysregulation of Angiopoietins Is Associated with Placental Malaria and Low Birth Weight. 2010;5(3):1-11.
13. Tran V, Weckman AM, Crowley VM, Cahill LS, Zhong K, Cabrera A, et al. EBioMedicine The Angiopoietin-Tie2 axis contributes to placental vascular disruption and adverse birth outcomes in malaria in pregnancy. EBioMedicine. 2021;73:103683.
14. Cui L, Mharakurwa S, Ndiaye D, Rathod PK, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance: Literature review and activities and findings of the ICEMR network. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(Suppl 3):57-68.
15. Ilmiah J, Sandi K, Review L. Potensi Kombinasi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oliefera*) dan Artemisia (*Artemisia annua*) Sebagai Antimalaria *Plasmodium falciparum* Pendahuluan. 2020;9:831-41.
16. Medina TS, Costa SPT, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. Malar J. 2011;10(1):264.
17. Perez-mazliah D, Langhorne J. CD4T-cell subsets in malaria : TH1 / TH2 revisited. 2015;5(January):1-9.
18. Perera MK, Herath NP, Pathirana SL, Alles HK, Mendis KN, Premawansa S, et al. Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha / IL-10 ratios with TNF2 allele in severe *P. falciparum* malaria patients in Sri Lanka. 2013;21-9.