



**PENGARUH *Andrographis paniculata*  
TERHADAP KAPASITAS PRODUKSI INTERLEUKIN 12  
PADA MENCIT YANG DIINOKULASI *Plasmodium berghei* ANKA**

**ARTIKEL ILMIAH**

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat  
menempuh Program Pendidikan Sarjana  
Fakultas Kedokteran

**Disusun oleh:  
Siska Nurohmah  
G2A 004 165**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2008**

***The Effect of Andrographis paniculata on Interleukin 12 Producing Capacity in BALB/c Mice Inoculated with Plasmodium berghei ANKA***

*Siska Nurohmah<sup>1</sup>, Kis Djamiatun<sup>2</sup>*

***Abstract***

***Background:*** Malaria is a disease caused by intracellular parasite. Interleukin-12 (IL-12) acts as an important cytokine in cellular immune response required for eliminating parasite. Previous studies showed that *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*) has a protective role during malaria infection, but there is no evidence that the protective mechanism of the herb is mediated by IL-12. Therefore, the objective of this study is to find out whether *A. paniculata* has an effect on IL-12 producing capacity in mice inoculated with *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) ANKA.

***Methods:*** This study was true experimental research using post test only control group design. Total sample used were 36 BALB/c mice, divided equally into treated and control groups. Treated groups were received 16.608 mg *A. paniculata* herb extract diluted in 0.1 ml CMC Na administered orally per day, started from 7 days pre-inoculation of *P. berghei* until 8 days post-inoculation (p.i.). Control group received 0.1 ml CMC-Na 0.5% in the same duration. IL-12 producing capacity was measured on day 3, 6, and 8 p.i. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test.

***Results:*** No significant difference in IL-12 producing capacity between treated and control group (day 3  $p=0.671$ ; day 6  $p=1.000$ ; day 8  $p=0.971$ ). The same result went for IL-12 producing capacity among days 3, 6, and 8 p.i. in both treated and control groups ( $p=0.872$ ).

***Conclusion:*** *A. paniculata* does not significantly affect IL-12 producing capacity in BALB/c mice inoculated with *P. berghei* ANKA.

***Keywords:*** *Interleukin-12, Plasmodium berghei ANKA, Andrographis paniculata.*

<sup>1</sup> Undergraduate student of Medical Faculty Diponegoro University

<sup>2</sup> Teacher Staff of Parasitology Department of Medical Faculty Diponegoro University

## **Pengaruh *Andrographis paniculata* terhadap Kapasitas Produksi Interleukin 12 pada Mencit BALB/c yang Diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA**

Siska Nurohmah<sup>1</sup>, Kis Djamiatun<sup>2</sup>

### **Abstrak**

**Latar Belakang:** Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit intraseluler. Interleukin 12 (IL-12) merupakan sitokin penting dalam respon imun seluler yang dibutuhkan untuk mengeliminasi parasit. Penelitian sebelumnya menunjukkan *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*) berperan protektif selama infeksi malaria namun belum terdapat bukti bahwa mekanisme protektifnya diperantarai IL-12. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh *A. paniculata* terhadap kapasitas produksi IL-12 mencit BALB/c yang diinokulasi *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) ANKA.

**Metode:** Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan rancangan *post test only control group design*. Sampel yang digunakan sebanyak 36 ekor mencit BALB/c, dibagi menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan mendapat 16,608 mg ekstrak methanol *A. paniculata* dilarutkan dalam 0,1 ml CMC-Na 0,5% diberikan secara oral setiap hari, mulai dari 7 hari pre-inokulasi *P. berghei* sampai 8 hari post-inokulasi (p.i.). Sementara kelompok kontrol diberikan 0,1 ml CMC-Na 0,5% dalam durasi yang sama. Kapasitas produksi IL-12 dihitung pada hari ke 3, 6, dan 8 post-inokulasi. Data dianalisis menggunakan uji *Kruskal wallis* dan uji *Mann whitney*.

**Hasil:** Tidak terdapat perbedaan bermakna dalam kapasitas produksi IL-12 antara kelompok perlakuan dan kontrol (hari 3  $p=0,671$ ; hari 6  $p=1,000$ ; hari 8  $p=0,971$ ). Demikian pula didapat hasil yang sama untuk kapasitas produksi IL-12 antar hari 3, 6, dan 8 p.i. baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol ( $p=0,872$ ).

**Kesimpulan:** *A. paniculata* tidak berpengaruh bermakna terhadap kapasitas produksi IL-12 pada mencit BALB/c yang diinokulasi *P. berghei* ANKA

**Kata Kunci:** Interleukin-12, *Plasmodium berghei* ANKA, *Andrographis paniculata*.

<sup>1</sup> Mahasiswa Semester VIII Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>2</sup> Staf Pengajar Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

## PENDAHULUAN

Malaria masih merupakan penyakit serius di daerah tropis dan subtropis sekalipun telah terdapat program pengendalian. Salah satu penyebabnya adalah resistensi parasit terhadap berbagai obat antimalaria.<sup>1</sup> Upaya untuk menemukan antimalaria yang aman dan efektif antara lain dengan melakukan penelitian terhadap tanaman obat yang secara empiris telah banyak digunakan. Salah satu tanaman yang potensial adalah *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*). Efek protektif *A. paniculata* terhadap malaria telah dibuktikan dengan adanya penurunan tingkat parasitemia,<sup>2</sup> serta peningkatan *survival rate* mencit yang diberi ekstrak *A. paniculata* selama infeksi *Plasmodium berghei* ANKA,<sup>3</sup> akan tetapi mediator respon imun yang memperantarai efek protektif tersebut belum terungkap.

Respon imun yang diperlukan untuk eliminasi parasit malaria membutuhkan interaksi antara respon imun alamiah yang diwakili oleh makrofag, neutrofil, dan sel *Natural Killer* (NK), dengan respon imun spesifik yang diatur oleh sel limfosit T *helper* (Th) terutama melalui dominasi relatif subset Th1.<sup>4</sup> *A. paniculata* diketahui berpengaruh terhadap imunitas alamiah melalui perannya meningkatkan hitung jenis netrofil dan monosit sirkulasi mencit BALB/c selama infeksi *P. berghei* ANKA.<sup>2</sup> Interleukin 12 (IL-12), suatu sitokin yang dihasilkan oleh monosit dan makrofag diketahui menstimulasi diferensiasi sel-sel limfosit Th0 ke arah subset Th1.<sup>5,6</sup> IL-12 juga menimbulkan proteksi yang ditunjukkan dengan adanya penurunan parasitemia dan peningkatan *survival rate* mencit yang diberi rekombinan IL-12 selama infeksi malaria.<sup>7,8</sup> Proteksi tersebut terjadi melalui respon Th1 dengan melibatkan produksi sitokin interferon gamma (IFN- $\gamma$ ),<sup>7,8</sup> dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ),<sup>8</sup> yang kemudian bekerja melalui mekanisme yang tergantung nitrit oksida (*NO-dependent mechanism*).<sup>7,8</sup> Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa respon imun yang

berperan protektif selama infeksi malaria stadium eritrositer melibatkan sitokin IL-12, IFN- $\gamma$ , dan NO. Namun, belum diketahui apakah efek protektif *A. paniculata* diperantarai oleh sitokin tersebut. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *A. paniculata* terhadap kapasitas produksi sitokin IL-12 pada mencit yang diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA. Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai mekanisme protektif ekstrak *A. paniculata* sebagai alternatif obat antimalaria.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan rancangan *post-test only control group design*. Sampel yang digunakan sejumlah 36 ekor mencit Balb/c yang didapat dari Pusat Antar Universitas (PAU) Yogyakarta, dengan kriteria inklusi berupa mencit betina, berat badan 20-25 gram, dan umur 6-8 minggu, sedangkan kriteria eksklusi yaitu apabila mencit sakit atau terdapat abnormalitas anatomis. Mencit diadaptasi selama satu minggu sebelum perlakuan, dilakukan pemeliharaan, dan dibagi menjadi dua kelompok secara acak, yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK Undip sebagai tempat pemeliharaan hewan coba dan pengambilan sampel, sedangkan pemeriksaan kapasitas produksi IL-12 dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK Undip.

Mulai dari 7 hari prainokulasi, pada mencit kelompok perlakuan diberikan ekstrak methanol *A. paniculata* dengan dosis 16,608 mg/hari yang dilarutkan dalam 0,1 ml CMC Na 0,5 %, sedangkan kelompok kontrol diberi 0,1 ml CMC Na 0,5 % dalam durasi yang sama. Pemberian dilakukan dengan menggunakan mikropipet secara oral. Ekstrak methanol daun *A. paniculata* tersebut diperoleh dari PT. Phapros Semarang.

Pada hari ke-7, baik mencit kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan diinokulasi *P. berghei* dengan dosis  $10^4$  eritrosit berparasit/0,1 ml/mencit., sementara pemberian ekstrak dan CMC Na 0,5% tetap dilanjutkan hingga hari ke-8 pasca inokulasi.

Pada hari ke-3, 6, dan 8 pasca inokulasi, diambil masing-masing 5 ekor mencit baik dari kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, kemudian mencit dimatikan dengan dislokasi tulang leher dan organ limpa mencit tersebut diambil secara aseptis. Setelah itu limpa diproses untuk dikultur dengan diberi lipopolisakarida (LPS) untuk menstimulasi pertumbuhan makrofag pada kultur tersebut.

Kapasitas produksi IL-12 diukur dari supernatan kultur sel limpa yang distimulasi LPS. Pengukuran dilakukan dengan metode ELISA, kemudian digunakan *microplate reader* untuk membaca *Optical Density* (OD). Konsentrasi IL-12 dihitung berdasarkan OD yang selanjutnya dikonversi dengan kurva standard hasil pembacaan *microplate reader*.

Data yang dikumpulkan berupa data primer hasil pengukuran kadar IL-12 dengan metode ELISA. Untuk analisis data antara kelompok perlakuan dan kontrol pada hari yang sama digunakan uji non parametrik *Mann-Whitney*, sedangkan untuk analisis data antar hari 3, 6, dan 8 pada kelompok perlakuan dan kontrol digunakan uji *Kruskal-Wallis*.

## HASIL PENELITIAN

**Tabel 1.** Hasil uji *Mann-Whitney* kadar IL-12 antara kelompok perlakuan dan kontrol p.i. *P. berghei* ANKA.

Hari ke	Kadar IL-12 (pg/ml) Rerata $\pm$ SD		<i>p</i>
	Perlakuan	Kontrol	
3	1,32 $\pm$ 0,48	1,14 $\pm$ 0,64	0,671
6	1,17 $\pm$ 0,92	0,96 $\pm$ 0,65	1,000
8	0,81 $\pm$ 0,44	0,95 $\pm$ 0,80	0,971

Hasil uji Mann-Whitney terhadap perbandingan kadar IL-12 antara kelompok kontrol dan perlakuan tidak menunjukkan perbedaan bermakna, baik pada hari ke-3, 6, maupun 8 p.i. *P. berghei* ANKA (Tabel 1.).

Untuk menguji Kadar IL-12 antar hari 3, 6, dan 8 p.i. baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan digunakan uji *Kruskall-Wallis*. Dari hasil uji tersebut didapatkan bahwa kapasitas produksi IL-12 antar hari juga tidak mengalami perbedaan bermakna ( $p=0,872$ ).

## PEMBAHASAN

IL-12 merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag, monosit, sel dendrit, dan limfosit B sebagai respon terhadap produk-produk bakterial dan parasit intraseluler.<sup>9</sup> Efek biologis dari IL-12 ditujukan pada sel T dan sel NK dengan menstimulasi tingkat proliferasi serta meningkatkan produksi IFN- $\gamma$  kedua jenis sel tersebut.<sup>10</sup> Peran protektif IL-12 pada infeksi malaria ditunjukkan pada penelitian menggunakan rekombinan IL-12; pemberian rekombinan IL-12 terbukti menguatkan perlindungan mencit A/J melawan infeksi *P. chabaudi* yang diperlihatkan dengan penurunan parasitemia dan *survival rate* mencit tersebut.<sup>8</sup> Hal yang sama ditunjukkan

oleh penelitian menggunakan mencit *wild-type* yang diinfeksi *P. berghei* ANKA, pemberian IL-12 pada mencit tersebut memperpanjang *survival*, memperlambat onset parasitemia, dan menurunkan tingkat parasitemia.<sup>7</sup> Proteksi yang ditimbulkan oleh IL-12 tersebut diperantarai IFN- $\gamma$ , serta terjadi melalui mekanisme yang tergantung NO (*NO-dependent mechanism*).<sup>7,8</sup>

*A. paniculata* diketahui berpengaruh terhadap imunitas alamiah melalui perannya meningkatkan hitung jenis netrofil dan monosit sirkulasi mencit BALB/c selama infeksi *P. berghei* ANKA,<sup>2</sup> dengan demikian diharapkan kadar IL-12 produk sel limpa yang distimulasi LPS juga mengalami peningkatan. Namun, pada penelitian ini ditunjukkan bahwa kadar IL-12 pada hari ke-3, 6, maupun 8 tidak mengalami peningkatan bermakna pada kelompok yang diberi *A. paniculata* dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 1.). Hal yang sama ditunjukkan pula pada produksi IL-12 antar hari yang dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil demikian menunjukkan bahwa IL-12 bukan mediator utama yang dipengaruhi oleh *A. paniculata* dalam menjalankan fungsi protektifnya. Akan tetapi hal ini perlu dibuktikan dengan menggunakan mencit yang dibuat mengalami inhibisi dalam produksi IL-12, misalnya dengan pemberian anti IL-12 mAb atau mencit *knock-out* IL-12. Apabila pada mencit tersebut pemberian *A. paniculata* tetap bersifat protektif, maka dapat dipastikan bahwa jalur yang digunakan *A. paniculata* tidak melalui IL-12.

Hasil pada penelitian ini juga mengindikasikan adanya mediator lain yang dipengaruhi *A. paniculata*. Mediator lain yang bersifat protektif selama infeksi malaria di antaranya sitokin IFN- $\gamma$  dan NO.<sup>7,8</sup> IFN- $\gamma$  berfungsi meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag dan memicu produksi NO yang bersifat parasitidal.<sup>4,11-13</sup> Induksi IFN- $\gamma$  ini terjadi melalui IL-12.<sup>10</sup> Akan tetapi dilaporkan pula bahwa sitokin IL-18 turut berperan dalam menstimulasi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel Th1 dan sel NK karena



IL-18 memiliki fungsi yang homolog dengan IL-12.<sup>14</sup> Hal ini mendasari kemungkinan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh *A. paniculata* terhadap IL-18.

Selama infeksi malaria, produksi IL-12 juga dipengaruhi oleh sitokin lain, di antaranya IL-10 dan TGF- $\beta$  yang diketahui dapat menekan ekspresi gen IL-12 pada tingkat transkripsi. Selain itu, dilaporkan pula bahwa eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* dapat berikatan dengan sel dendrit penghasil IL-12 dan mengganggu fungsi sel tersebut.<sup>15</sup>

## **KESIMPULAN**

Pemberian *A. paniculata* per oral tidak meningkatkan kapasitas produksi IL-12 dari limpa mencit BALB/c yang diinokulasi *P. berghei* ANKA.

## **SARAN**

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh *A. paniculata* terhadap mediator respon imun lain, di antaranya IL-18.
2. Untuk membuktikan bahwa efek protektif *A. paniculata* tidak diperantarai IL-12 perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan mencit *knock-out* IL-12 atau mencit yang diberi anti-IL-12 mAb.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Puji dan Syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada dr. Kis Djamiatun selaku pembimbing dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini, kepada dr. Neni Susilaningsih atas revisi beliau terhadap proposal penulis, kepada *Fundamental Research Program* Direktorat

Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini, kepada PT. Paphros Tbk. yang menyediakan ekstrak methanol *A. paniculata* untuk penelitian ini, kepada staf Laboratorium Parasitologi dan Bioteknologi FK Undip, serta kepada teman-teman dan semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Gunawan S. Epidemiologi malaria. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria: epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, & penanganan. Jakarta: EGC; 2000. 1-15.
2. Prasetyo AA. Hubungan Prosentase Neutrofil Sirkulasi dengan Tingkat Parasitemia *Plasmodium berghei* ANKA pada Mencit Balb/c yang Diberi Ekstrak Herbal *Andrographis paniculata*. Semarang: Universitas Diponegoro, 2004. Karya Tulis Ilmiah Mahasiswa
3. Djamiatun, Sudaryanto, Henny KH, Agoes W. Pengaruh ekstrak herbal *Andrographis paniculata* (sambiloto) terhadap anemia dan survival mencit BALB/c selama infeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Media Medika Indonesiana 2004;39:146-53.
4. Kwiatkowski D, Perlmann P. Inflammatory processes in the pathogenesis of malaria. In: Wahlgren M, Perlmann P, editor. Malaria: molecular and clinical aspects. Amsterdam: Harwood Academic Publisher; 1999. 329-427.
5. Interleukin 12. [online]. [cited 2007 dec 18];[1 screen]. Available from: URL:<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/Spring2003/Bowie/home.html>
6. Tan RS, Feng C, Asano Y, Kara AU. Altered immune response of interferon regulatory factor 1-deficient mice against *Plasmodium berghei* blood-stage malaria infection in mice. Infect Immun 1999 May;67(5):2277-83.
7. Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. J Immunol 1995 Sep 1;155(5):2545-56.
8. Interleukin 12. [online]. [cited 2007 dec 18];[1 screen]. Available from: URL:[http://www.wikipedia.org/wiki/interleukin\\_12.html](http://www.wikipedia.org/wiki/interleukin_12.html)
9. Su Z, Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. Infect Immun 2000;68:4399-406.
10. Sedegah M, Finkelman F, Hoffman LS. Interleukin 12 induction of interferon  $\gamma$ -dependent protection against malaria. Proc Natl Acad Sci USA 1994 Oct 91:10700-2.
11. Nugraha A, Harijanto PN, Datau EA. Imunologi pada malaria. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria: epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, dan penanganan. Jakarta: EGC; 2000. 128-50.

12. Troye-Blomberg M, Weidanz WP, Van der Heyde H. The role of T-cells in immunity to malaria and the pathogenesis of disease. In: Wahlgren M, Perlmann P, editor. *Malaria: molecular and clinical aspects*. Amsterdam: Harwood Academic Publisher; 1999. 403-25.
13. Sher A, Wynn TA, Sacks DL. The immune response to parasites. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. 1171-200.
14. Singh RP, Kashiwamura S, Rao P, Okamura H, Mukherjee A, Chauhan VS. The role of IL-18 in blood-stage immunity against murine malaria *Plasmodium yoelii* 265 and *Plasmodium berghei* ANKA. *J Immunol* 2002 May 1;168(9):4674-81.
15. Pardoux C, Ma X, Gobert S, Pellegrini S, Mayeux P, Gay F, Tarinchieri G, Chouaib S. Downregulation of interleukin-12 (IL-12) responsiveness in human T cells by transforming growth factor- $\beta$ : relationship with IL-12 signaling. *Blood* 1999; 93:1448.