



**PENGARUH PEMBERIAN *Andrographis paniculata*
TERHADAP PRODUKSI INTERFERON GAMMA
PADA MENCIT YANG DIINOKULASI *Plasmodium berghei* ANKA**

ARTIKEL ILMIAH

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat
menempuh Program Pendidikan Sarjana

Fakultas Kedokteran

**Disusun oleh:
Yuanita Agustin**

G2A 004 185

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2008

**The Effect of *Andrographis paniculata*
on Interferon Gamma Producing Capacity
in BALB/c Mice Inoculated by *Plasmodium berghei* ANKA
Yuanita Agustin¹, Kisdjamiatun²**

Abstract

Background: *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*) can stimulate immune response of BALB/c mice during the infection of *Plasmodium berghei* ANKA (*P. berghei* ANKA). While interferon-gamma (IFN- γ) has been proved to be protective during the infection. Yet there is no proof that the protective mechanism of the herb is mediated by IFN- γ . The objective of this study was to find out whether *A. paniculata* has an effect on IFN- γ producing capacity in mice inoculated by *P. berghei* ANKA.

Methods: This study was pure experimental with post test only control group design. It used 36 BALB/c mice, divided randomly into treated and control groups. Each mice in treated group received 16,608 mg methanol extract of *A. paniculata*, solved in CMC-Na 0,5%, started from 7 days pre-inoculation until 8 days post-inoculation (p.i.). While control group received CMC-Na 0,5% 0,1 ml/day/mice with same duration. All of the mice was inoculated with *P. berghei* ANKA on day 7 after the treatment started. IFN- γ producing capacity was measured on day 3, 6, 8 p.i. Data was processed using Kruskal Wallis and Mann Whitney statistical analysis test.

Results: IFN- γ producing capacity of treated group was significantly higher than control group on day 3 p.i. of *P. berghei* ANKA. In treated group, there was significant difference of IFN- γ concentration between day 3 and 6 p.i. In control group, there were significant differences of IFN- γ concentration between day 3 and 6, and also day 3 and 8 p.i. of *P. berghei* ANKA.

Conclusion: *A. paniculata* herb extract increase spleenocytes' IFN- γ producing capacity on day 3 p.i. of *P. berghei* ANKA.

Keywords: *Andrographis paniculata*, IFN- γ , *Plasmodium berghei* ANKA

¹ Undergraduate student of Medical Faculty of Diponegoro University

² Academic staff of Parasitology Departement of Medical Faculty of Diponegoro University

**Pengaruh Pemberian *Andrographis paniculata*
terhadap Produksi Interferon Gamma
pada Mencit yang Diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA
Yuanita Agustin¹, Kisdjamiatun²**

Abstrak

Latar belakang: *A. paniculata* dapat meningkatkan respon imun mencit BALB/c selama infeksi *P. berghei* ANKA. IFN- γ telah dibuktikan bersifat protektif selama infeksi *P. berghei* pada mencit. Belum ada bukti bahwa mekanisme kerja *A. paniculata* diperantarai oleh IFN- γ . Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian *A. paniculata* terhadap kapasitas produksi IFN- γ pada mencit BALB/c yang diinokulasi *P. berghei* ANKA.

Metode: Penelitian eksperimental murni dengan *post test only control group design* dengan 36 ekor mencit BALB/c, dibagi random menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Masing-masing mencit pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak methanol *A. paniculata* 16,608 mg yang dilarutkan dalam CMC-Na 0,5%, mulai 7 hari preinokulasi sampai dengan 8 hari pascainokulasi. Sedangkan pada kelompok kontrol diberikan CMC-Na 0,5% 0,1 ml/hari/mencit dengan durasi yang sama. Semua mencit diinokulasi *P. berghei* ANKA pada hari ke-7 pasca pemberian perlakuan. Kapasitas produksi IFN- γ diukur pada hari ke-3, 6, 8 pasca inokulasi. Analisis data dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney*.

Hasil: Produksi IFN- γ kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA. Pada kelompok perlakuan, terdapat perbedaan kadar IFN- γ yang bermakna pada uji beda antar hari ke-3 dan ke-6 pascainokulasi. Pada kelompok kontrol, kadar IFN- γ menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji beda antar hari ke-3 dan ke-6, serta antar hari ke-3 dan ke-8 pascainokulasi *P. berghei* ANKA.

Kesimpulan: Pemberian ekstrak herbal *A. paniculata* meningkatkan kapasitas produksi IFN- γ sel limpa mencit BALB/c pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA.

Kata Kunci: *A. paniculata*, IFN- γ , *P. berghei* ANKA

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

² Staff Pengajar Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

PENDAHULUAN

Malaria, suatu penyakit yang disebabkan oleh protozoa obligat intraseluler dari genus *Plasmodium*, masih merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di daerah tropis dan subtropis. Terdapat sekitar 300 sampai 500 juta kasus penyakit malaria dan diantaranya mengakibatkan 1,5 sampai 2,7 juta kematian setiap tahun.¹ Berbagai upaya dilakukan untuk menurunkan penyakit dan kematian yang diakibatkan malaria. Suatu masalah penting yang mempersulit penanggulangan malaria ialah berkembangnya resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria.¹ Resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin pertama kali terjadi pada akhir tahun 1950 di Indochina dan Amerika Selatan, kemudian berkembang di sebagian besar wilayah endemik malaria.^{1,2} Resistensi *P. vivax* terhadap klorokuin pertama kali dilaporkan di Papua New Guinea. Resistensi terhadap sulphonamide-pyrimethamine telah ditemukan di Asia Tenggara, Amerika Selatan, serta Afrika Barat dan Timur.²

A. paniculata (sambiloto) telah digunakan sebagai obat tradisional di Asia dan negara-negara Skandinavia sejak abad 18 untuk mengobati berbagai penyakit infeksi dan penyakit kronis. *A. paniculata* mempunyai efek farmakologis yang luas, diantaranya dapat meningkatkan imunitas tubuh.³ Respon imun berperan penting dalam proteksi terhadap malaria.⁴ *A. paniculata* merupakan salah satu tanaman obat antimalaria yang telah banyak diteliti. Penelitian *in vivo* telah membuktikan bahwa *A. paniculata* memperpanjang survival disamping dapat menurunkan tingkat parasitemia *P. berghei* ANKA.^{5,6} *P. berghei* ANKA merupakan parasit yang berakibat lethal.⁷ *A. paniculata* juga mempunyai sifat immunomodulator.^{8,9} *A. paniculata* dapat meningkatkan respon imun alamiah yang berupa peningkatan hitung jenis netrofil sirkulasi mencit BALB/c selama infeksi *P. berghei* ANKA.⁶ Demikian pula respon imun spesifik yaitu peningkatan hitung jenis limfosit sirkulasi.⁸

Selama perjalanan malaria, diproduksi sejumlah sitokin, diantaranya IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF, LT, dan IL-6, yang diduga berkontribusi dalam memperbesar imunitas dan juga patofisiologi penyakit.¹⁰ IFN- γ merupakan salah satu sitokin yang telah dibuktikan bersifat protektif selama infeksi *P. berghei* pada mencit. Pemberian IFN- γ telah terbukti menghambat parasitemia selama infeksi *P. berghei* ANKA.¹¹ Sifat protektif IFN- γ juga telah dibuktikan pada mencit yang diinokulasi *P. berghei* dan diberi immunomodulator. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan kadar IFN- γ serum dan efek proteksi berupa peningkatan survival dan memperlama awal parasitemia.¹² Belum ada bukti bahwa mekanisme kerja *A. paniculata* diperantarai oleh IFN- γ .

Berdasarkan hal-hal di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut: Apakah ada pengaruh pemberian *A. paniculata* terhadap kapasitas produksi IFN- γ mencit BALB/c yang diinokulasi *P. berghei* ANKA? Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian *A. paniculata* terhadap kapasitas produksi IFN- γ mencit BALB/c yang diinokulasi *P. berghei* ANKA. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian *A. paniculata* terhadap respon imun mencit BALB/c.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan *post test only control group design*. Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, yaitu minimal 5 sampel tiap satu kelompok perlakuan. Sampel penelitian ini terdiri dari 36 ekor mencit betina strain BALB/c, umur 6-8 minggu, berat badan 20-25 gram, yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas UGM Yogyakarta. Tiga puluh enam ekor mencit diadaptasikan selama 1 minggu. Mencit diberi makan dan minum

secara *ad libitum* selama dalam pemeliharaan. Setelah menjalani masa adaptasi, tiga puluh enam ekor mencit tersebut dibagi menjadi dua kelompok secara acak (randomisasi), yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dimana tiap kelompok akan dibagi tiga, untuk diamati pada hari ke-3,6, dan 8 pascainokulasi. Masing-masing mencit pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak methanol *A. paniculata* 16,608 mg yang dilarutkan dalam CMC-Na 0,5%, sedangkan pada kelompok kontrol diberikan CMC-Na 0,5% selama 7 hari preinokulasi sampai dengan 8 hari pascainokulasi. Semua mencit diinokulasi *P. berghei* ANKA pada hari ke-7 pasca pemberian perlakuan. Pada hari ke-3,6, dan 8 pascainokulasi, mencit dibunuh dengan cara dislokasi cervical kemudian dilakukan isolasi dan kultur sel limpa. Selanjutnya diperiksa kadar IFN- γ yang terdapat dalam supernatan kultur sel limpa yang diberi stimulasi *Phyto Haem Agglutinin* (PHA).

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer berupa kapasitas produksi IFN- γ produk sel limpa yang diukur dengan metode ELISA. Data yang diperoleh diolah dengan program komputer *SPSS 15.0 for Windows*. Untuk beda antar kelompok pada tiap hari pengamatan menggunakan uji *Mann Whitney*. Untuk beda antar hari pada satu kelompok menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji dengan *Kruskal Wallis* didapatkan perbedaan yang bermakna, sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Uji beda rata-rata kadar IFN- γ produk sel limpa antar kelompok

Hari ke-	Rerata \pm SD		<i>p</i>
	Perlakuan	Kontrol	
3	4,53 \pm 2,68	0,24 \pm 0,53	0,007*
6	1,72 \pm 1,71	4,09 \pm 0,53	0,066
8	2,01 \pm 1,16	2,79 \pm 2,09	0,465

* signifikan untuk $p < 0,05$

Pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA, produksi IFN- γ kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Tidak terdapat perbedaan bermakna produksi IFN- γ antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-6 dan ke-8 pascainokulasi *P. berghei* ANKA.

Tabel 2. Uji beda rata-rata kadar IFN- γ produk sel limpa antar hari pengamatan pascainokulasi *P. berghei* ANKA

Hari ke-	Perlakuan	Kontrol
3 dibanding 6	0,047*	0,005*
3 dibanding 8	0,094	0,034*
6 dibanding 8	0,463	0,106

* signifikan untuk $p < 0,05$

Pada kelompok perlakuan, kadar IFN- γ menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji beda antar hari ke-3 dan ke-6 pascainokulasi *P. berghei* ANKA. Sedangkan pada uji beda antar hari ke-3 dan ke-8, serta antar hari ke-6 dan ke-8 tidak didapatkan perbedaan kadar IFN- γ yang bermakna. Pada kelompok kontrol, didapatkan perbedaan kadar IFN- γ yang bermakna pada uji beda antar hari ke-3 dan ke-6, serta antar hari ke-3 dan ke-8 pascainokulasi *P. berghei* ANKA. Kadar IFN- γ kelompok kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji beda antar hari ke-6 dan ke-8.

PEMBAHASAN

A. paniculata mempunyai efek terhadap Plasmodium, disamping itu juga mempunyai sifat immunomodulator.^{8,9,13} Komponen *1,2 dihydroxy-6,8 dimethoxy xanthone* yang diisolasi dari *A. paniculata* mempunyai aktivitas anti plasmodial terhadap *P. falciparum*. Percobaan *in vivo* pada mencit *Swiss* yang diinfeksi selama 4 hari menunjukkan reduksi substansial parasitemia (62%) diberi dosis 30 mg/kg.¹³

Aktivitas imunostimulator *A. paniculata* diantaranya berupa peningkatan proliferasi limfosit, yang ditunjukkan oleh fraksi *dichloromethane* dan pecahannya yaitu *andrographolide*, *14-deoxy andrographolide* dan *14-deoxy-11,12-didehydro andrographolide*.⁸ Sifat antiinflamasi *A. paniculata* khususnya ditunjukkan oleh komponen *andrographolide*. Penelitian membuktikan bahwa penambahan *andrographolide* pada makrofag yang distimulasi LPS dan ditambah IFN- γ menyebabkan hambatan produksi NO.⁹

Respon imun berperan penting dalam proteksi terhadap malaria.⁴ Selama perjalanan malaria, diproduksi sejumlah sitokin, diantaranya IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF, LT, dan IL-6.¹⁰ IFN- γ , sitokin berupa glikoprotein, disekresi oleh sel Th1, CD8⁺, dan sel NK.¹⁴ Salah satu peran potensial IFN- γ dalam imunitas terhadap infeksi stadium eritrositer adalah meningkatkan aktivitas makrofag sebagai APC dan fagosit.^{4,14} *In vitro*, IFN- γ mampu menekan pertumbuhan *P. berghei* melalui mekanisme yang tergantung NO.¹⁵ IFN- γ dapat mengaktifasi ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS atau *NOS2*) pada makrofag dan neutrofil, sehingga akan terjadi sintesis NO, dimana NO bersifat menghambat pertumbuhan *Plasmodium*.^{11,15} IFN- γ merupakan salah satu mediator yang mempengaruhi resistensi pejamu terhadap *Plasmodium*. Pemberian IFN- γ telah terbukti menghambat parasitemia selama infeksi *P. berghei* ANKA.¹¹

Percobaan pada mencit yang diinokulasi *P. berghei* dan diberi immunomodulator menunjukkan bahwa IFN- γ bersifat protektif. Pemberian immunomodulator IL-18 meningkatkan kadar IFN- γ serum dan memberikan efek proteksi berupa peningkatan survival dan memperlama awal parasitemia. Pemberian anti IL-18 antibodi memperparah infeksi dan memperpendek survival mencit yang diinokulasi *P. berghei*.¹²

Pada penelitian ini, produksi IFN- γ kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA. Proteksi terhadap stadium eritrositer *P. berghei* sangat tergantung pada IFN- γ , dimana sitokin ini meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag terhadap sel darah merah terinfeksi. Pemberian anti IFN- γ antibodi meningkatkan parasitemia secara progresif dan berakibat fatal.¹⁶ Pada penelitian sebelumnya, didapatkan tingkat parasitemia pada hari ke-6 pascainokulasi *P. berghei* ANKA pada kelompok perlakuan lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol.⁶ Dengan demikian, IFN- γ telah terbukti memperantarai penurunan tingkat parasitemia pada kelompok yang diberi *A. paniculata*.

Selama infeksi malaria, terdapat keseimbangan dinamis antara peran NO sebagai antiparasit dan imunoregulator. Penghambatan sintesis NO menyebabkan peningkatan parasitemia selama infeksi *P. chabaudi*, hal ini menunjukkan bahwa NO bersifat parasitidal. Di lain pihak, NO dapat menekan proliferasi sel Th1, sehingga secara tidak langsung menurunkan produksi IFN- γ .¹⁷ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kapasitas produksi NO sel limpa kelompok perlakuan lebih rendah dibanding kontrol tanpa herbal pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA.¹⁸ Pada penelitian ini, peningkatan kapasitas produksi IFN- γ kelompok perlakuan pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA kemungkinan didasari oleh penurunan produksi NO.

Mediator respon imun lain, yakni interleukin-12 (IL-12), kemungkinan juga dapat memperantarai peningkatan kapasitas produksi IFN- γ kelompok perlakuan pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA. Sebagai respon terhadap adanya produk bakteri atau parasit intraseluler, monosit atau makrofag memproduksi IL-12, yang berefek biologik pada sel T, yakni menstimulasi differensiasi sel T CD4⁺ ke arah sel

Th1,¹⁴ dimana sel Th1 merupakan produsen utama IFN- γ ,¹⁷ sehingga kapasitas produksi IFN- γ akan meningkat.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak herbal *A. paniculata* meningkatkan kapasitas produksi IFN- γ sel limpa mencit BALB/c pada hari ke-3 pascainokulasi *P. berghei* ANKA.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mediator respon imun lain yang digunakan *A. paniculata* sebagai mekanisme protektif terhadap malaria.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat-Nya hingga terselesaikannya artikel ini. Penulis mengucapkan terima kasih kepada dr. R. Ay. Kisdjamiatun MSc selaku pembimbing, dr. Neni Susilaningsih MSi selaku reviewer proposal, *Fundamental Research Program* Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini, PT. Paphros Tbk yang telah menyediakan ekstrak methanol *A. paniculata* untuk penelitian ini, staf Laboratorium Parasitologi dan Bioteknologi FK UNDIP, serta 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. Day KP. The Epidemiology of Malaria. In: Wahlgren M, Perlmann P, editor. Malaria: molecular & clinical aspects. Australia: Harwood Academic Publisher; 1999.57-81.
3. *Andrographis paniculata* in-depth review.[online].[cited 2007 Mar 30];[1 screen]. Available from URL: <http://www.altcancer.com/andcan.htm>
4. Blomberg MT, 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 & clinical aspects. Australia: Harwood Academic Publisher; 1999.403-38.
5. Djamiatun, Sudaryanto, Henny K H, 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.
6. 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.
7. The *Plasmodium berghei* research model of malaria.[online]. [cited 2007 Mar 30];[7 screens]. Available from URL: http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model_01.htm
8. Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. J Ethnopharmacol 2004 Jun;92(2-3):291-5.
9. Chiou WF, Chen CF, Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. Br J Pharmacol 2000 Apr;129(8):1553-60.
10. Tambajong EH. Patobiologi malaria. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria: epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, & penanganan. Jakarta: EGC; 2000.55-150.
11. Curfs JH, van der Meide PH, Billiau A, Meuwissen JH, Eling WM. *Plasmodium berghei*: recombinant interferon-gamma and the development of parasitemia and cerebral lesions in malaria-infected mice. Exp. Parasitol 1993 Sep;77(2):212-23.
12. 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.
13. Dua VK, Ojha VP, Roy R, Joshi BC, Valecha N, Devi CU, Bhatnagar MC, Sharma VP, Subbarao SK. Anti-malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. J Ethnopharmacol 2004 Dec; 95(2-3):247-51.
14. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar. Ed 7. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006.119-39.

15. Kwiatkowski D, Perlmann P. Inflammatory processes in the pathogenesis of malaria. In: Wahlgren M, Perlmann P, editor. Malaria: molecular & clinical aspects. Amsterdam: Harwood Academic Publisher; 1999.329-62.
16. Yoneto T, Yoshimoto T, Wang CR, Takahama Y, Tsuji M, Waki S, Nariuchi H. Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage Plasmodium berghei XAT but neither NO production nor NK cell activation is critical. J Infection and Immunity 1999 May; 67(5):2349-56.
17. Taylor RAW, Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. J Immunology 1999 April; 67(1):1-9.
18. Yuwono AP. Pengaruh *Andrographis paniculata* terhadap kapasitas produksi nitric oxide sel T limpa mencit Balb/c selama infeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Semarang: Universitas Diponegoro, 2007. Karya Tulis Ilmiah Mahasiswa.