

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL HERBA MENIRAN (*Phyllanthus niruri*) TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT Swiss YANG DIINFEKSI *Plasmodium berghei*

The Effect of the Administration of Meniran Herba (Phyllanthus niruri) towards the Macrophage Phagocytosis Activity of Swiss Mice, Infected by Plasmodium Berghei

Akrom¹, Mustofa², dan Indwiani Astuti²

Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

This studies was carried out to evaluate the influence of ethanol extract of *Phyllanthus niruri* (EEP_N) to the macrophage phagocytosis activity of male *Swiss* mice during *P. berghei* infection. The laboratory experimental research conducted on 75 male *Swiss* mice divided in five group. The group one to three as experimental group were ingested EEP_N 5, 10 and 100 mg/kgBW/day respectively. The group four as positive control group is ingested malaria vaccine *P. berghei* on erythrocyte stadium and the group as hegative control group is ingested water. The EEP_N, malaria vaccine and water is ingested during fourteen day. On the fourteenth daye ach group was infected by *P. berghei*. The phagocytosis activity of macrophage response was observed on the zeroth, second, fifth, and the seventh day after the infection. The macrophage phagocytosis activity response was evaluated with latex test and parasitemia level of the tested animal. The data was processed with SPSS program; the average differences between groups were analyzed by one-way ANOVA test and correlation test to evaluate the correlation among the macrophage phagocytosis activity with parasitemia level.

The result showed that male *Swiss* mice infected by *P. berhei* with EEP_N 10 mg/kgBW/day group increase the macrophage phagocytosis activity better than EEP_N 100 and 5 mg/kgBW/day group. The parasitemia level in EEP_N 10 mg/kgBW/day group is lower and the appearance of parasitemia is later than the EEP_N 100 and 5 mg/kgBW/day group on the same measurement ($p < 0.05$). The macrophage phagocytosis activity in 10 mg/kgBW/day is better than the EEP_N 100 and 5 mg/kgBW/day. The correlation test shows a correlation between the macrophage phagocytosis activity with the parasitemia level ($r < -0.5$).

In conclusion, on the male *Swiss* mice infected by *P. berghei*, the EEP_N 10 mg/kgBW/day gives stimulating effect to the macrophage phagocytosis activity better than the ethanol extract of *P. niruri* 100 and 5 mg/kgBW/day. The immunostimulant effect of *P. niruri* ethanol extract is temporary.

Keywords: *P. niruri* ethanol extract, immunostimunts, *P. berghei*, macrophage, phagocytosis

- 1) Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
- 2) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

PENGANTAR

Malaria masih merupakan salah satu masalah utama penyakit infeksi di Indonesia. Di Indonesia diperkirakan terdapat 70 juta penduduk di daerah endemis dengan 6 juta kasus malaria tiap tahun dan tingkat kematian pada 1000 penderita. Spesies *Plasmodium* yang banyak dijumpai di Indonesia adalah *Plasmodium falciparum* dan *vivax*. Infeksi *P. falciparum* pada orang yang tidak imun dapat menimbulkan gejala klinis yang berat dan apabila tidak diobati dapat menyebabkan kematian^{1,2}. Derajat keparahan penyakit akibat infeksi *P. falciparum* diduga berhubungan dengan imunitas seluler^{3,4,5,6,7}.

Makrofag berperan penting pada mekanisme kerja sistem imunitas, baik pada sistem imunitas seluler maupun sistem imun humoral^{9,10}. Makrofag berperan baik pada respon imun seluler alamiah maupun respon imun seluler spesifik. Sebagai efektor pada sistem imun seluler, makrofag berperan untuk memusnahkan *Plasmodium*, terutama pada tahap eritrosit, baik melalui mekanisme fagositosis langsung maupun melalui mekanisme tak langsung dengan melepaskan *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) dan sitokin^{3,5,11,12,13,14,15}.

Infeksi oleh parasit malaria akan menginduksi sistem imun sebagai sistem pertahanan. Parasit yang masuk segera dihadapi oleh sistem imun tak spesifik, dengan fungsi utamanya adalah untuk mengeliminasi atau paling tidak menghambat perkembangan parasit dalam tubuh sehingga hospes tetap sehat. Makrofag merupakan salah satu sel efektor yang berperan untuk mengeliminasi parasit melalui mekanisme fagositosis pada sistem imun tak spesifik. Ingesti partikel asing oleh fagosit makrofag, misalnya mikroorganisme atau parasit malaria, diikuti berbagai efek pada granulosit fagosit, antara lain: (1) Konsumsi oksigen meningkat, hal ini menyebabkan pembentukan radikal oksigen dan meningkatkan pelepasan hidrogen peroksida. Anion superoksida, hidrogen peroksida dan hidroksil radikal yang terbentuk ini disebut ROI; (2) Peningkatan glikolisis melalui *hexose monophosphate shunt*; (3) Lisosom pecah dan enzim hidrolitiknya tumpah ke dalam vakuola fagosit menjadi bentuk vakuola digestif atau fagolisosom^{8,16,17,18,19}.

Aktifitas fagositosis makrofag dapat ditingkatkan dengan pemberian zat-zat imunostimulansia, baik berupa vaksin maupun senyawa kimiawi tertentu termasuk kimia alamiah^{3,4,5,12,20,21,22,23,24}. Pemberian zat-zat imunostimulansia terbukti dapat meningkatkan imunitas seluler penduduk terhadap infeksi malaria^{19,25,26}.

Phyllanthus niruri adalah tanaman yang selama ini dipakai luas sebagai antimalaria oleh masyarakat di daerah endemik malaria^{27,28,29}.

Di samping sebagai antimalaria, *P. niruri* juga memiliki efek sebagai imunomodulator^{20,22}. Uji laboratorium pada mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei*, menunjukkan bahwa ekstrak etanol *P. niruri* pada dosis 100 mg /Kg BB – 400 mg /Kg BB mempunyai efek sebagai antiplasmodial³⁰. Ma'at²⁰ menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *P. niruri* dengan dosis 3 mg/Kg BB/hari pada mencit sehat meningkatkan daya imun mencit secara humoral maupun seluler. Ekstrak segar *P. tenellus* yang disuntikkan intraperitoneal dua kali sehari sebanyak 10 mg/Kg dan 50 mg/Kg juga terbukti meningkatkan aktivitas makrofag dalam memproduksi NO²². Pada uji klinis *P. niruri* menunjukkan efektivitas yang lebih pada terapi herpes zoster maupun ISPA jika dibandingkan dengan plasebo³¹. Diduga bahwa perbaikan tersebut oleh karena efek imunostimulansia *P. niruri* yang banyak mengandung senyawa flavonoid, polifenol maupun alkaloid^{27,31,32,33,35,36}.

Berdasarkan latar belakang yang dijelaskan di atas maka permasalahan penelitian yang diajukan pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol *P. niruri* terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit *Swiss jantan* selama diinfeksi *P. berghei*?

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak etanol *P. niruri* terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit galur *Swiss jantan* yang diinfeksi *P. berghei*.

CARA PENELITIAN

Penelitian menggunakan seperangkat alat untuk ekstraksi antara lain timbangan analitik (sartorius), *blender* (national), saringan kain, soklet, *rotary evaporator* (laboratory Equipment Sydney), water bath dan cawan porselin digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol *P. niruri*. Sentrifuse, alat gelas dan pipet digunakan untuk pembuatan vaksin malaria *P. berghei* stadium eritrosit. Inkubator CO₂ (NUAIRE), sentrifuse, microplate (Nalge Nunc International, Denmark), *microplate reader*, *inverted microscope*, kamera, minor set, spuit injeksi 10 cc, *laminar air flow hood*, timbangan analitik (sartorius), alat gelas, hemositometer, pipet *Eppendorf*, objek glas, alat hitung, dan *disposable* Petri (Nalge Nunc International, Denmark) digunakan untuk melakukan uji respon imunitas seluler. Mikroskop cahaya, gelas objek, gelas penutup, dan mesin hitung digunakan untuk menghitung tingkat parasitemia.

Bahan untuk pembuatan Ekstrak etanol *P. niruri* adalah bahan simplisia daun *P. niruri* dan larutan etanol 95 %. Bahan untuk pembuatan vaksin malaria *P. berghei* stadium eritrosit adalah darah mencit *Swiss jantan* yang mengandung parasit *P. berghei* stadium eritrosit,

saponin, larutan PBS dan formalin 0,6 %.

Bahan untuk uji aktivitas fagositosis langsung makrofag antara lain kultur sel makrofag, lateks dan bahan pewarna giemsa. Medium tumbuh yang digunakan untuk kultur sel makrofag adalah medium RPMI - 1640 (GIBCO) yang mengandung: 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS); 1 mM *sodium Bicarbonat*; 2 mM *L-Glutamin*; 100 u *Penicillin* dan 0,5 mg *Streptomycin*. Bahan untuk menilai tingkat parasitemia adalah apusan darah tepi mencit *Swiss* jantan yang telah diinfeksi, yang diambil setiap dua hari sekali, kemudian dipulas dengan pulasan giemsa.

Hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah mencit galur *Swiss* jantan yang berumur 6-8 minggu dengan berat berkisar 20 - 30 gram yang diperoleh dari laboratorium parasitologi FK UGM. Parasit uji yang digunakan pada penelitian adalah *P. berghei* galur ANKA (PbA), salah satu malaria model pada mencit yang diperoleh dari laboratorium Parasitologi FK UGM.

Pembuatan ekstrak etanol *P. niruri* dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM dengan metode sokletasi. Bahan simplisia *P. niruri* setelah kering kemudian dibuat serbuk dengan cara digiling sampai halus dan disaring dengan penyaring tertentu sehingga diperoleh serbuk yang homogen. Setiap 50 gram serbuk kering *P. niruri* dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan dalam alat soklet, kemudian ditambahkan 300 ml etanol 95 % dan dihubungkan dengan pendingin balik. Proses ekstraksi dilakukan sampai sari yang terdapat dalam tanaman *P. niruri* habis (ditandai dengan cairan penyari telah bening, kira-kira 6 jam). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator hingga etanolnya habis. Ekstrak disimpan dalam botol steril²⁹.

Pembuatan vaksin diawali dengan menginfeksi *P. berghei* ke tubuh mencit *Swiss* jantan, dengan cara menyuntikkan secara intraperitoneal 0,2 ml inokulum yang mengandung 1×10^6 parasit stadium eritrositik pada tiap mencit. Pembuatan vaksin *P. berghei* stadium eritrositik dilakukan dengan cara Playfair dkk, cit Supargiyono³. Darah dari mencit *Swiss* dengan parasitemia lebih dari 60 % diambil melalui pungsi jantung dan ditampung pada tabung yang telah diberi heparin. Kemudian dicuci dengan *Phosphat Buffered Saline* (PBS) 3x dengan cara disentrifugasi 3000 RPM, *buffy coat* yang terbentuk dibuang. Eritrosit yang diperoleh dilisiskan dengan cara menambah 40 volume 0,01 % saponin (Eastman Ltd) dalam PBS selama 30 menit pada suhu 37°C. Suspensi parasit yang didapat disentrifus pada 15.000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Pelet yang didapat diresuspensikan dalam PBS dan disentrifus 150 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas

(berpigmen) yang mengandung parasit dipisahkan dan diresuspensikan dalam 0,6 % formalin dalam PBS selama 5 menit pada suhu kamar. Parasit yang diperoleh dicuci 2x dengan PBS. Parasit kemudian diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi 1×10^9 parasit / ml dan dapat disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

Mencit galur *Swiss* jantan berumur antara 6–8 minggu yang dipilih secara acak dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 15 ekor. Kelompok I adalah kelompok kontrol negatif dimana mencit diberi 0,2 cc air. Kelompok II adalah mencit dengan pemberian ekstrak etanol *P. niruri* 5 mg/Kg BB/hari. Kelompok III adalah mencit dengan pemberian ekstrak etanol *P. niruri* sebesar 10 mg/kg BB/hari. Kelompok IV adalah mencit dengan pemberian ekstrak etanol *P. niruri* sebesar 100 mg/ Kg BB/hari dan Kelompok V adalah sebagai kelompok kontrol positif dimana mencit mendapat vaksin malaria stadium eritrosit.

Pemberian larutan ekstrak etanol *P. niruri* dilakukan setiap hari secara peroral menggunakan kanula intragastrikum selama 14 hari sebelum hewan coba diinfeksi kemudian dilanjutkan sampai akhir pengambilan data³⁷. Untuk pemberian ekstrak etanol sesuai dosis pada setiap kelompok hewan coba terlebih dahulu dibuat larutan induk. Dari larutan induk dibuat lagi larutan dengan kadar yang lebih rendah sesuai dengan kebutuhan tiap kelompok hewan coba sehingga pada setiap pemberian perlakuan kira-kira hewan coba mendapatkan 0,2 ml larutan sesuai dengan kebutuhan. Pemberian vaksin *P. berghei* stadium eritrosit sebagai imunisasi dilakukan dengan cara suntikan intraperitoneal 0,2 ml crude vaksin *P. berghei* yang mengandung 2×10^8 parasit ekstraseluler ditambah dengan 0,2 ml *freuds complete adjuvant* (FCA) dan di booster 2x dengan vaksin yang sama ditambah *freuds incomplete adjuvant* (FICA). Booster dilakukan dengan selang waktu 2 minggu. Infeksi pada hewan coba dilakukan dengan cara menyuntikkan intraperitoneal 0,2 ml inokulum yang mengandung 1×10^8 parasit stadium eritrositik tiap mencit²¹.

Dari kelima kelompok mencit pada hari ke-0, ke-2, ke-5 dan ke-7 setelah diinfeksi 3 ekor dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70 %, kemudian disuntikkan 10 ml medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu selama 3 menit sambil digoyang-goyang secara perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara menekan rongga dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifuse pada 1200 rpm, 4°C selama 10 menit.

Supernatan dibuang, *pellet* diresuspensi dengan RPMI yang mengandung FCS 10 %. Jumlah sel dihitung dengan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan larutan *tryphan blue*, kemudian ditambahkan dengan medium komplet sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ / ml. Suspensi sel ditumbuhkan dalam *mikrokultur* 24 sumuran yang telah diberi *coverslips* bulat. Setiap sumuran diisi 200 mikroliter (5×10^5 sel). Sel diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5 %, 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium komplet sebanyak 1 ml tiap sumuran dan diinkubasikan 2 jam. Sel dicuci 2 x dengan RPMI 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dalam medium komplet dilanjutkan sampai 24 jam²¹.

Uji fagositosis dilakukan *in vitro* menggunakan *latex beads* diameter 3 mikroliter²¹. Partikel lateks diresuspensikan dalam PBS sehingga didapatkan konsentrasi $2,5 \times 10^7$ / ml. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2x dengan medium RPMI, kemudian ditambahkan suspensi lateks 200 µL/sumuran, diinkubasikan dalam incubator CO₂ 5 %, 37° C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan Giemsa 20 %. Persentasi sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan banyaknya partikel lateks yang difagositosis dihitung dari sekitar 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Perhitungan prosentasi sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan jumlah partikel lateks intrasel yang diingesti oleh makrofag diulang sebanyak 3 kali.

Uji perbedaan rerata yang dipergunakan adalah uji ANAVA satu jalan. Uji korelasi digunakan untuk menguji hubungan antara aktivitas fagositosis makrofag, persentasi sekresi ROI dan proliferasi limfosit dengan derajat parasitemia. Pada penelitian ini analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan dengan pemberian vaksin atau imunostimulansia akan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag, sehingga makrofag lebih aktif melakukan fagositosis pada mencit *Swiss* yang diinfeksi *P. berghei*. Untuk mengetahui perubahan aktivitas fungsional makrofag peritoneum mencit *Swiss* sebagai sel efektor selama infeksi *P. berghei* pada hewan coba yang telah mendapatkan EEPN diamati aktivitas fagositosis non spesifik makrofag yaitu dengan uji lateks *in vitro*, kemudian dihitung jumlah partikel lateks intrasel pada 100 makrofag

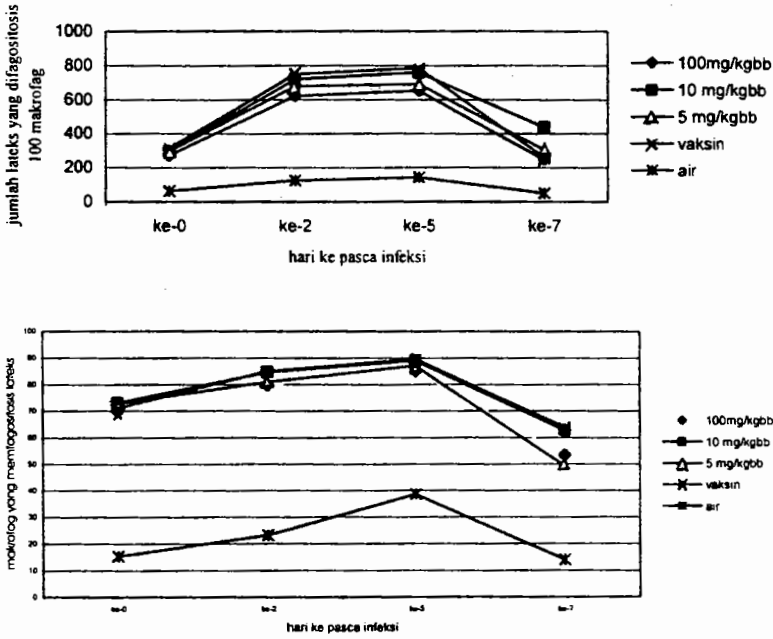
dan persentase makrofag yang melakukan fagositosis. Hasil pengamatan terhadap aktivitas makrofag hewan coba dalam memfagositosis partikel lateks tampak pada Gambar 1 dan 2 (A & B).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag hewan coba kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada kelompok air tetapi lebih rendah dari kelompok vaksin. Persentase makrofag mencit *Swiss* yang melakukan aktivitas fagositosis maupun jumlah partikel lateks intrasel pada kelompok perlakuan pada semua pengukuran lebih tinggi dari kelompok air tetapi lebih rendah dari kelompok vaksin. Diantara kelompok perlakuan, kelompok dengan dosis 10 mg/kgbb/hari EEPN memiliki aktivitas fagositosis paling tinggi kemudian diikuti oleh kelompok dosis 5 mg/kgbb/hari EEPN dan yang terendah adalah kelompok dengan dosis 100 mg/kgbb/hari EEPN. Puncak aktivitas fagositosis makrofag terjadi pada hari ke-5 pasca infeksi dan pada hari ke-7 pasca infeksi terjadi penurunan aktivitas fagositosis.

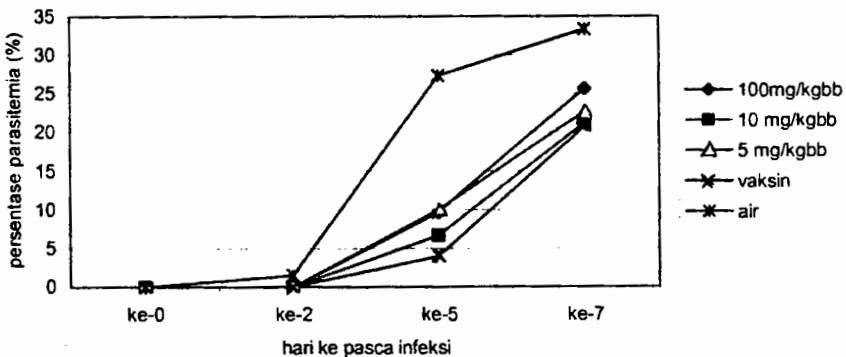
Pada pengamatan hari ke-0, mencit sebelum diinfeksi, kelompok 10 mg/kgBB/hari EEPN memiliki rerata persentase aktivitas fagositosis makrofag tertinggi yaitu sebesar $73,00 \pm 1,00$ % diikuti dengan kelompok 5 mg/kgBB/hari EEPN ($72,67 \pm 3,06$ %), kelompok vaksin ($71,00 \pm 2,00$ %), Kelompok 100 mg/kgBB/hari EEPN ($70,00 \pm 1,00$ %) dan yang paling rendah adalah kelompok air ($15,33 \pm 3,51$ %). Rerata jumlah partikel latek intrasel, kelompok vaksin memiliki rerata jumlah partikel latek intrasel tertinggi yaitu 314 buah diikuti oleh kelompok 10, 5 dan 100 mg/kgbb/hari EEPN yang masing-masing memiliki rerata jumlah partikel latek intrasel pada 100 sel makrofag sebesar 300 buah, 297 buah dan 265 buah. Kelompok air memiliki rerata jumlah partikel lateks intrasel paling rendah yaitu 61 buah. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol *P. niruri* pada mencit *Swiss* sebelum diinfeksi *P. berghei* meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, sebagaimana pemberian vaksin.



Gambar 1. Gambaran partikel lateks intrasel yang difagositosis makrofag mencit *Swiss* hari ke-5 pasca infeksi *P. berghei*, setelah sebelumnya mendapatkan praperlakuan selama 14 hari dengan 5, 10 dan 100 mg/kgbb/hari EEPN, pewarnaan giemsa dan perbesaran 200x.



Gambar 2. Aktivitas fagositosis makrofag mencit *Swiss* jantan yang diinfeksi *P. berghei* dengan praperlakuan ekstrak etanol *P. niruri* 5, 10 dan 100 mg/kgbb/hari selama 14 hari. Gambaran rerata jumlah partikel lateks intrasel yang difagositosis oleh 100 makrofag mencit *Swiss* hari ke-5 pasca infeksi (A) dan (B) rerata persentase sel makrofag yang melakukan aktivitas fagositosis.



Gambar 3. Persentase parasitemia pada empat kali pengukuran pada mencit *Swiss* jantan setelah diinfeksi *P. berghei* 1×10^8 dengan praperlakuan ekstrak etanol *P. niruri* 5, 10 dan 100 mg/kgbb/hari selama 14 hari untuk kelompok perlakuan, kelompok kontrol positif mendapatkan vaksin *P. berghei* stadium eritrosit 2 minggu sebelum infeksi dan kelompok kontrol negatif mendapatkan air.

Puncak persentase aktivitas fagositosis makrofag dicapai pada pengamatan yang ke-3, yaitu pada hari ke-5 pasca infeksi, dimana kelompok vaksin memiliki rerata persentase aktivitas fagositosis makrofag tertinggi yaitu $89,67 \pm 1,52\%$, kemudian diikuti oleh kelompok 10 mg/kgBB/hari EEPN ($89,00 \pm 1,00\%$), kelompok 5 mg/kgBB/hari EEPN ($87,00 \pm 1,00\%$), kelompok 100 mg/kgBB/hari EEPN ($85,00 \pm 1,00\%$) dan kelompok air memiliki rerata persentase aktivitas fagositosis makrofag yang paling rendah yaitu $23,67 \pm 1,52\%$. Rerata jumlah partikel latek intrasel pada puncak aktivitas fagositosis tertinggi dicapai oleh kelompok vaksin (783 buah), diikuti oleh kelompok perlakuan 10 (759 buah), 5 (692 buah) dan 100 mg/kgbb/hari EEPN (659 buah) dan yang paling rendah adalah kelompok air (69 buah). Pada puncak kemampuan fagositosis makrofag kelompok perlakuan memiliki kemampuan fagositosis 5 – 6x normal. Pada pengukuran yang keempat terjadi penurunan persentase fagositosis makrofag, tetapi kelompok vaksin tetap memiliki rerata persentase aktivitas fagositosis makrofag paling tinggi, diikuti oleh kelompok 10 mg/kgBB/hari EEPN, kelompok 5 mg/kgBB/hari EEPN, kelompok 100 mg/kgBB/hari EEPN dan yang paling rendah adalah kelompok air. Perbedaan rerata persentase makrofag yang melakukan fagositosis antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan adalah sangat bermakna ($p < 0,01$). Diantara kelompok perlakuan yang memiliki persentase aktivitas fagositosis makrofag paling tinggi adalah kelompok 10 mg/kgBB/hari EEPN, kemudian kelompok 5 mg/kgBB/hari EEPN dan yang paling rendah adalah kelompok 100 mg/kgBB/hari EEPN.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa pada tahap awal infeksi semua kelompok hewan coba menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag yang semakin meningkat sesuai dengan peningkatan jumlah parasit sampai mencapai puncak tertentu yaitu pada pengamatan ketiga (hari ke-5 pasca infeksi) yang kemudian diikuti dengan penurunan yaitu hari ke-7 pasca infeksi. Hal itu menunjukkan bahwa parasit *P. berghei* merupakan imunogen yang mampu membangkitkan respon imun seluler alamiah hewan coba dalam bentuk fagositosis makrofag untuk mengeliminir parasit^{3,18,21,22}. Pemberian vaksin malaria maupun ekstrak etanol *P. niruri* terbukti dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag sebagaimana pada penelitian sebelumnya^{5,20,21}. Aktivitas fagositosis makrofag sebanding dengan jumlah partikel lateks yang diingesti makrofag maupun persentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks. Semakin banyak jumlah partikel lateks intrasel menunjukkan semakin tingginya kemampuan ingesti makrofag^{3,4,18,20,24}.

Gambaran apusan darah tipis dari mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* sebagian besar berupa bentuk trofozoit yang mengisi 2/3

bagian sel dan mempunyai kecenderungan untuk menginfeksi eritrosit muda. Tingkat parasitemia dari masing – masing kelompok hewan coba tampak pada gambar 3. Kelompok 10 mg /kgBB/hari EEPN dan kelompok vaksin memiliki tingkat parasitemia terendah pada semua waktu pengamatan sebaliknya kelompok air dan kelompok 100 mg/kgBB/hari EEPN memiliki tingkat parasitemia paling tinggi. Kelompok 10 mg/kgBB/hari EEPN dan kelompok vaksin juga kelompok yang mengalami parasitemia lebih belakangan (yaitu pada hari keempat pasca infeksi) jika dibandingkan ketiga kelompok lainnya dimana parasitemia mulai nampak sejak hari ke tiga meskipun masih sangat rendah. Kelompok air adalah kelompok yang memiliki tingkat parasitemia paling tinggi. Kelompok 10 mg/kgBB/hari EEPN memiliki tingkat parasitemia lebih rendah dari pada kelompok 5 mg/kgBB/hari EEPN dan kelompok 100 mg/kgBB/hari EEPN pada semua pengamatan. Perbedaan rata-rata tingkat parasitemia tiap kelompok pada berbagai pengamatan berbeda secara bermakna. Demikian juga perbedaan rata-rata tingkat parasitemia antar kelompok pada suatu pengamatan juga berbeda secara bermakna ($p < 0,05$).

Dari hasil ini menunjukkan bahwa vaksin maupun ekstrak etanol *P. niruri* pada awalnya memiliki kemampuan untuk menghambat tingkat parasitemia pada mencit yang diinfeksi *P. berghei*, tetapi kemampuan membendung parasitemia ini hanya bersifat sementara. Pada tahap berikutnya sejalan dengan penurunan kemampuan fagositosis dan aktivitas parasitidal makrofag, mencit mengalami penambahan parasitemia secara cepat sehingga pada akhirnya semua kelompok mencit memiliki angka parasitemia yang tinggi dan berakhir dengan kematian pada semua kelompok mencit. Gagalnya respon imun terhadap malaria pada semua kelompok hewan coba menyebabkan semua mencit akhirnya meninggal.

Infeksi *P. berghei* pada mencit *Swiss* yang tidak mendapatkan vaksinasi akan berakhir dengan kematian^{4,21}. Mencit *Swiss* yang diinfeksi *P. berghei* dan mendapatkan vaksinasi tetapi tanpa mendapatkan tambahan ajuvan juga mengalami tingkat parasitemia yang tinggi dan tetap berakhir dengan kematian, sebaliknya mencit yang diinfeksi *P. berghei* dan mendapat vaksinasi dengan ditambah ajuvan memiliki tingkat parasitemia rendah dan pada akhirnya mampu terhindar dari kematian akibat *P. berghei*^{4,21}. Imunisasi dengan menggunakan vaksin *P. berghei* fase eritrosit ditambah dengan ajuvan juga mampu membangkitkan respon imun terhadap infeksi *P. vinckei pitteri* pada mencit^{3,5}.

Fitri⁴ membuktikan bahwa imunisasi pada mencit yang diinfeksi

P. berghei dapat menekan lonjakan parasitemia dan menyelamatkannya dari kematian akibat infeksi *P. berghei* apabila limfosit T yang terstimulasi mampu mensekresi IFN γ dengan kadar cukup, yang dibarengi dengan produksi TNF α oleh makrofag pada masa awal infeksi yang kemudian kadar TNF α ini turun untuk masa infeksi berikutnya^{4,15}. Tetap tingginya kadar TNF α pada masa infeksi selanjutnya berakibat pada memberatnya derajat infeksi dan berakibat kematian pada hewan coba^{8,38}.

Tingginya persentase sel makrofag yang mampu melakukan aktivitas fagositosis berkaitan dengan kemampuan mencit mengatasi infeksi *P. berghei*^{21,22,39}. Dari hasil di atas tampaknya ekstrak etanol *P. niruri* hanya mampu memacu makrofag sehingga meningkatkan aktivitas fagositosis, tetapi hal ini tidak dilanjutkan dengan stimulasi yang cukup kuat pada limfosit T, sehingga aktivasi fagositosis makrofag tidak segera diikuti dengan produksi IFN γ secara cukup untuk membangkitkan respon imun spesifik^{11,14,20,40,41,42,43,44}. Hasil uji korelasi antara aktivitas fagositosis dengan tingkat parasitemia menunjukkan bahwa terjadi hubungan terbalik antara tingkat parasitemia dengan aktivitas fagositosis ($r = -0,354$).

Wijayanti^{18,19} mendapatkan kenyataan bahwa aktivitas fagositosis sangat berkaitan dengan tingkat parasitemia pada mencit *Swiss* yang diinfeksi *P. berghei* dan mendapatkan vaksin dengan ajuvan. Fitri⁴ juga menunjukkan bahwa tingkat parasitemia pada mencit *Swiss* yang diinfeksi *P. berghei* berkaitan dengan kadar IFN γ , dimana semakin tinggi kadar IFN γ yang dapat disekresi oleh limfosit yang teraktivasi semakin rendah tingkat parasitemia dan semakin besar kemungkinannya terhindar dari kematian. Sebaliknya tetap tingginya kadar TNF α yang diproduksi limfosit dapat menekan respon imun hospes sehingga menurunkan aktivitas fagositosis dan parasitidal makrofag^{4,20}.

Salah satu kandungan biokimiawi bioflavonoid *P. niruri* yang potensial sebagai imunostimulansia adalah kuersetin^{23,28,34,44}. Kuersetin dapat menginduksi sintesis *nitric-oxide sintase*, suatu enzim yang diperlukan untuk pembentukan oksida nitrat. Oksida nitrat adalah suatu senyawa yang mampu bertindak sebagai mikrobisidal, mengaktivasi makrofag dan antiinflamasi^{34,45}. Disamping kuersetin, senyawa-senyawa polifenol, flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid juga memiliki efek sebagai imunostimulansia³⁴.

Pemberian ekstrak etanol *P. niruri* yang mengandung senyawa polifenol, flavonoid, alkaloid dan saponin yang bersifat imunostimulansia pada mencit *Swiss* akan menstimulasi komponen sistem imun, termasuk diantaranya adalah aktivitas fagositosis makrofag sebagai sistem pertahanan awal infeksi malaria^{16,17,46,47,48}.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah ekstrak etanol *P. niruri* meningkatkan aktivitas fagositosis mencit Swiss jantan yang diinfeksi *P. berghei*. Dosis 10 mg/kgbb/hari EEPN memiliki efek stimulasi aktivitas fagositosis makrofag paling baik dibandingkan dosis pemberian lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ibrahim, A. 2000. Intensifikasi Penatalaksanaan Kasus Malaria. Dalam Lestari, E. W. dkk. (Peny.) *Proseding Konfrensi Internasional Soil transmitted Helminth Control dan Seminar serta Rapat Kerja Nasional Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasitik Indonesia*. Denpasar : Dit. P2B2, Ditjen. PPM & PLP
2. Harijanto, P. N. (ed.) 2000. *Malaria epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*. Jakarta : EGC
3. Supargiyono, 1995. Cell mediated immunity in malaria: changes in numbers of mononuclear phagocytes during *Plasmodium vinckei petteri* infection in immunized and non-immunized mice, *BIK*, 27, 1:1-12
4. Fitri, L.K. 1996. *Kaitan antar kadar interferon α dan Tumor Necrosis Factor dengan imunitas terhadap infeksi malaria*. Jogjakarta : Pasca Sarjana UGM
5. Supargiyono, 1997. Imunitas seluler pada infeksi malaria: perubahan aktivitas sel fagosit berinti satu selama infeksi *Plasmodium vinckei petteri*, *MKI*, 47, 12: 614-22
6. Doolan, D.L., Hoffman, S.L., 1999. IL-12 and NK-cells are required for antigen-spesifik adaptive immunity against malaria initiated by CD⁸ T cellain the P. yoelli model, *The Journal of Immunology*, 163:884-892
7. Mc Kenna, Tsuji, M., Sarjotti, M., Sacci, J.B., Witney, A.A., Azad, A.F., 2000. $\alpha\alpha$ T cells Are a Component of Early Immunity against Preerythrocytic Malaria Parasites. *Infeccion and Immunity* , .68, 4: 2224 – 30
8. Kaufmann, S. H. E., Sher, A. and Ahmed, R. (ed.) 2002. *Immunology of Infectious Disease*. Washington DC : ASM Press
9. Warren, K. S. (ed.) 1993. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection. Third Edition*. Oxford : Blackwell Scientific Publication
10. Mota, M. M., Brown, K.N., Holder, A.A. Jarra, W., 1998. Acute *Plasmodium chabaudi* Malaria infection Induces Antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. *Infeccion and immunity*, 66,9: 4080 – 4086
11. Shalaby, M. R., Agrawal, B.B., Rinderknecht, E., Svedersky, L.P., Finkle, B.S., Palladindo, M.A., 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon G and Tumor Nekrosis Factor. *The Journal of Immunology*, 135, 3: 2069 – 2073

12. Wijayanti, M. A., Suprgiyono dan Fitri, L.K. 1999. Sekrei Tumor Necrosis Factor dan Reactive Oxygen Itermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang distimulasi dengan antigen terlarut *Plasmodium Falciparum*. *BIK.*, 31, 1: 23 - 7
13. Choudhury, H.R., Sheikh, N.A., Bancroft, G., Katz, D.R., de Souza, B., 2000. Early nonspeific immune responses and Immunity to blood-stage nonlethal *P.yoelii* malaria, *Infection And Immunity*, 68, 11:6127-6132
14. Matsukawa, A., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., 2000. Chemokins and innate immunity, *Rev. Immunogenet.*, 2, 3:339-58
15. Muniz-Junqueira, M.I., dos Santos-Neto, L.L., Tosta, C.E., 2001. Influence of tumoe necrosis factor á on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro, *Cell Immunol.*, 208, 2:73-9
16. Klein, J. 1991. Defence reactions mediated by phagocyts. Dalam J. Klein . *Immunology*. Oxford : Black well Scientific Publications
17. Dale, M. M., Foreman, J. C. and Fan, T.D. (ed.) 1994. *Textbook of Immunopharmacology*. Oxford : Blackwell Scientific Publications
18. Wijayanti, M.A., 1999. Kemampuan fagositosis makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi Pberghei, *BIK*, 31, 4:213-8
19. Hidayati, T., Akrom, 2003. Respon imun pada infeksi malaria, *Mutiara Medika*, 1, 2:85-95
20. Ma'at, S., 1997. *Phyllanthus niruri L sebagai imunomodulator pada mencit (Desertasi)*, Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga
21. Wijayanti, 1996. *Peranan makrofag dalam imunitas terhadap infeksi malaria*, Yogyakarta: Program Pasca Sarjana UGM
22. Ignacio, S.R., Ferreira, J.L., Almeida, M.B., Kubelka, C.F., 2001. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. *J. Ethnopharmacol*, 74, 2: 181 - 7
23. Raj Nayarana, K., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential, *Indian Journal of Pharmacology*; 33: 2-16
24. Subramoniam, A.Evans, D.A., Rajasekharan, S., Pushpangadan, P., 2000. Efect of *Trichopus zeylanicus* Gaertn (active fraction) on Phagocytosis by Peritoneal Macrophages and Humoral Immune in Response in Mice. *Indian Journal of Pharmacology*, 32: 221 - 5
25. Beck, H.P., Felger, I., Genton, B., Alexandedr, N., Al-Yaman, F., Anders, R. F., Alpers, M., 1995. Humoral and cell-mediated immunity to the *P. Palciparum* ring-infected eritrocyt surface antigen in adult population exposed to highly endemic malaria. *Infection and immunity*, 63, 2: 596 - 600
26. Anstey, N.M., Weinberg, J.B., Hassanali, M.Y., Mwaikambo, E.D., Manyenga, D., Misukonis, M.A., Arnelle, D.R., Hollis, D., McDonald, M.I., Granger, D.L., 1996. Nitric oxide in Tnzanian children with malaria: invers relationship between malaria severity and nitric oxide production / nitric

oxide synthase type 2 expression, *JEM*, 84:557-567

27. Subarnas, A. dan Sidik 1993. *Phyllanthus niruri* L., Kimia, Farmakologi dan Penggunaannya sebagai Obat Tradisional. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 2, 4: 13 - 15.
28. Sangat, H.M., Zuhud, E.A.M. dan Damayanti, E.K. 2000. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
29. Mursito, B., 2002. *Ramuan Tradisional untuk Penyakit malaria*, Penebar Swadaya, Jakarta
30. Tona, L., Ngimbi, N.P., Tsakala, M., Mesia, K., Cimanga, K., Apers, S., De Bruyne, P., Pieters, L., Totte, J., Vlietinck, A.J., 1999. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa Congo. *J. Ethnopharmacol*, 68, (1-3): 193 - 203
31. Kurniati, S. C. 2002. Pengobatan oral infeksi virus varicella-zoster dengan kombinasi ekstrak phyllanti Herba dan terapi standar dibandingkan dengan terapi standar tunggal. *Dexa media*, 15, 4: 109 - 17
32. Labadie, R.P. 1986. *Immunomodulative activities by constituents and preparations of medicinal plants*. Surabaya : Makalah dipresentasikan pada Symposium on Research of Medicinal Plants and Expo Jamu
33. Ma'at, S. 2001. *Obat Asli Untuk Pelayanan Kesehatan Formal*. Jember : Seminar sehari Potensi Tanaman Obat Indonesia dalam Menunjang Pelayanan Kesehatan dan Perekonomian Indonesia
34. Middleton JR, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. The effects of Plant Flavonoids on Mammalian cells : Implication for inflammation, Heart Disease and Cancer, *Pharmacological Reviews*; 52:673-751
35. Labs, R., 2001. *Chanca piedra monograph*, Lima
36. Liu, J., McIntosh, H., Lin, H., 2001. Genus *Phyllanthus* for Chronic hepatitis B virus infection : a systematic review. *J. Viral Hepat*, 8, 5: 358 - 66
37. Ratnaningsih, T. 2001. *Efek ekstrak polifenol teh hijau terhadap respon imun seluler menciit selama infeksi Salmonella typhimurium*. Jogjakarta: Pasca Sarjana UGM.
38. Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Schmid, D., Aichelburg, A., Graninger, W., Kremsner, P.G., 1998. Reciprocal regulation of Th1 and Th2 - cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *P. falciparum* malaria, *Infection and immunity*, 66, 12:6040-44
39. Abbas, A.K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. 1994. *Cellular and Molecular Immunology*. Second Ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company
40. Hoffman, S.L., Sedegah, M. and Malik, A. 1994. Cytotoxic T Lymphocytes in Humans Exposed to *Plasmodium Falciparum* by immunization or Natural Exposure. Dalam Oldstone, M. B. A. (eds). *Cytotoxic T Lymphocytes in Humans viral and Malaria Infections*. London: Springer Verlag
41. Angulo, I. and Fresno, M., 2002. Cytokines in The Pathogenesis of and Protection against Malaria, *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 9, 6: 1145-1152.

42. Artavanis-Tsakonas, K., Riley, E.M., 2002. Innate immune response to malaria: Rapid induction of IFN α from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected eritrocytes, *J.Immunol*, 169, 6:2956-63
43. Torre, D., Speranza, F., Giola, M., Matteelli, A., Tambini, R., Biondi, G., 2002. Role of The1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *P. falciparum* malaria, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9,2:348-51.
44. Kenny, M.T., Balistreri, F.J., Torney, H.L., 1990. Flavonoid modulation of murine neutrophil cytokinesis, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 12, 3: 527-41
45. Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Horn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwan, P.A.M., 2001. *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application*, *Am. J. Clin. Nutr*; 74: 418-25
46. Janeway, C. H., Travers, P., Hunt, S., walport, M., 1994. *Immunobiology the immune system in health and disease*. London : Current Biology Ltd.
47. Borchers, A.T., Keen, C.L., Stern, J.S., 2000. Inflammation and Native American medicine: the role of botanical, *Am.J.Clin Nutr*; 72:339-47
48. Kresno, S.B., 2001. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. Keempat. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia