

# Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata*) dalam Menurunkan Kadar TNF $\alpha$ dan Meningkatkan Kadar NO Uji Coba pada Mencit Swiss yang Diinokulasi *Plasmodium Berghei* ANKA

## The Effectiveness of Soursop (*Annona muricata*) Leaf Extract in Lowering TNF $\alpha$ and Increasing NO Level a Study on Swiss mice inoculated with *Plasmodium berghei* ANKA

Maria Estela K<sup>1</sup>, Fransisca Prameshinta H<sup>2</sup>, Edi Dharmana<sup>3</sup>, RA Kisdjamiatun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Imunologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi

<sup>2</sup>Akademi Analis Kesehatan 17 Agustus 1945 Semarang

<sup>3</sup>Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

### ABSTRAK

Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) mengandung antioksidan seperti flavanoid, *acetogenins* yang memiliki peran sebagai antiplasmodium secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan menguji pengaruh ekstrak etanol daun sirsak terhadap penurunan kadar *Tumor Necrosis Faktor-alpha* (TNF $\alpha$ ) dan peningkatan kadar *Nitric Oxide* (NO) pada limpa mencit Swiss betina yang diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA. Desain penelitian ini adalah *Post Test only randomized Control Group Design*. Sampel terdiri dari mencit Swiss normal (K-), mencit yang diinokulasi *P. berghei* ANKA (K+), mencit yang diberikan ekstrak daun sirsak 100 mg/KgBB/hari (P1), mencit yang diberikan ekstrak daun sirsak 200mg/KgBB/hari (P2), mencit yang diinokulasi *P. berghei* ANKA dan diberikan ekstrak 100mg/KgBB/hari (P3), mencit yang diinokulasi *P. berghei* ANKA dan diberikan ekstrak 200mg/KgBB/hari (P4). Rerata kadar TNF $\alpha$  kelompok P4 lebih rendah di banding kelompok yang lain (X=403,88). Uji *Bonferroni* kelompok P4 berbeda bermakna ( $p=0,04$ ). Rerata kadar NO kelompok P3 (0,93) lebih tinggi dibanding K(+) dan P4. Hasil uji *Mann whitney* menunjukkan bahwa kadar NO berbeda bermakna antara K(+) dengan K(-), K(+) dengan P1, K(+) dengan P2, K(-) dengan P4, P1 dengan P4, P2 dengan P4. Hasil uji korelasi *Spearman Rank* antara kadar TNF $\alpha$  dan NO menunjukkan adanya korelasi ( $p < 0,05$ ).

**Kata Kunci:** *Annona muricata*, NO, *P. berghei* ANKA, TNF $\alpha$

### ABSTRACT

Extract of soursop (*Annona muricata*) leaves contain antioxidants such as flavonoids and *acetogenins* which have a role as antiplasmodium *in vitro*. This study aimed to examine the effect of the ethanol extract of soursop leaves in decreasing TNF $\alpha$  level and increasing NO level in spleen of female Swiss mice inoculated with *Plasmodium berghei* ANKA. The study used post test only randomized control group design. The sample consisted of normal Swiss mice (K), mice inoculated with *P. berghei* ANKA (K +), mice given soursop leaf extract 100mg/kgbw/day (P1), mice given soursop leaf extract 200 mg/kgbw/day (P2), mice inoculated with *P. berghei* ANKA and given extract 100mg/kgbw/day (P3), mice inoculated with *P. berghei* ANKA and given extract 200mg/kgbw/day (P4). The mean level of TNF $\alpha$  group P4 was lower than the other groups (X=403,88). *Bonferroni* test of group P4 was significantly different ( $p=0,04$ ). The mean level of NO group P3 (0,93) was higher than the K(+) and P4. Results of *Mann Whitney* show that the NO level was significantly different between K(+) and K(-), K(+) with P1, K(+) with P2, K(-) with P4, P1 with P4, P2 with P4. The result of *Spearman Rank* test showed a correlation between the levels of TNF $\alpha$  and NO ( $p < 0,05$ ).

**Keywords:** *Annona muricata*, NO, *P. berghei* ANKA, TNF $\alpha$

---

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 29, No. 1, Februari 2016; Korespondensi: Maria Estela K. Bagian Imunologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi, Jl. Letjen Soeprapto No. 33Telanai Pura Jambi Tel. (0741) 60246 Email: mria\_uniya@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Plasmodium*, termasuk parasit golongan protozoa ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles spp.* Malaria merupakan masalah kesehatan masyarakat lebih dari 100 negara, diperkirakan 200 juta infeksi setiap tahun, dan lebih dari 500 ribu kematian setiap tahunnya (1). Malaria masih merupakan penyakit yang endemis di sebagian besar wilayah di Indonesia. Kematian akibat malaria disebabkan oleh lingkungan dan resistannya obat anti malaria yang sering digunakan terhadap *Plasmodium* (2).

*Plasmodium berghei* ANKA merupakan *plasmodium* yang menyebabkan malaria serebral pada tikus yang mempunyai persamaan dengan *P. falciparum* pada manusia (3). Daur hidupnya sangat kompleks dimulai dari masuknya sporozoit dari gigitan nyamuk, kemudian parasit berkembang di dalam hati dan membentuk banyak merozoit dan menginvasi sel darah merah (4). Eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* menyebabkan aktivasi sel makrofag untuk mensekresikan *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ), *nitric oxide* (NO), *interleukin 12* (IL-12) untuk mengaktifkan sel NK dan mensekresikan IFN $\gamma$  (5).

Terjadinya progresivitas dari serebral malaria dikaitkan dengan tingginya konsentrasi dari TNF- $\alpha$  di serum. Penelitian secara *in vitro* menemukan sitokin serum TNF $\alpha$  lebih tinggi pada penderita malaria serebral dibandingkan penderita malaria non serebral (6). Produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan seperti TNF- $\alpha$  menyebabkan meningkatnya regulasi ekspresi reseptor endotel sehingga menghasilkan NO yang berhubungan dengan kejadian serebral malaria (7).

Bioavailabilitas NO yang rendah berperan pada mencit dengan serebral malaria menyebabkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah, aliran darah dan oksigen otak sedikit (8). Kadar NO yang tinggi mampu membunuh parasit yang akan berkembang menjadi malaria serebral (9). Pemberian suplemen NO dari luar terbukti dapat mencegah kadar NO yang rendah dengan meningkatkan aliran darah, mencegah terjadinya vasokonstriksi, mencegah inflamasi pada pembuluh darah serta mengurangi perdarahan (8).

Sejauh ini belum ditemukannya obat malaria yang efektif. Banyak tumbuhan yang dapat dijadikan senyawa antimalaria sebagai pengganti obat malaria yang toksik bagi parasit salah satunya adalah tanaman daun sirsak (*Annona muricata*) (10). Kandungan kimia dari daun sirsak salah satunya flavonoid dan *acetoginin* mempunyai peran sebagai antiplasmodia dan mempengaruhi kadar TNF- $\alpha$  dan NO (10,11). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efektivitas ekstrak daun *Annona muricata* dalam menurunkan kadar TNF $\alpha$  dan meningkatkan kadar NO pada mencit *Swiss* yang diinfeksi *P. berghei* ANKA.

## METODE

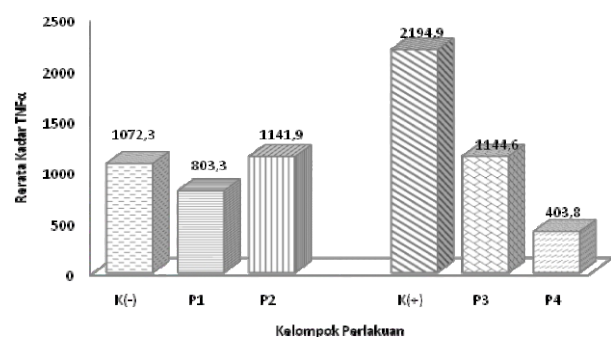
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *post test only randomized control group design*. Sampel penelitian adalah 36 ekor mencit *Swiss* betina usia 6-8 minggu, berat badan 20-25 gram dengan jumlah sampel tiap kelompok 6 ekor mencit yang terdiri dari 6 kelompok yaitu: kelompok kontrol negatif (mencit sehat tanpa diinfeksi dan di terapi), kontrol positif (diinfeksi *P. berghei* ANKA tanpa terapi), kelompok perlakuan 1 (diberikan ekstrak daun sirsak

100mg/KgBB/hari tanpa inokulasi), kelompok perlakuan 2 (diberikan ekstrak daun sirsak 200mg/KgBB/hari tanpa inokulasi), kelompok perlakuan 3 (diberikan ekstrak daun sirsak 100mg/KgBB/hari dan diinfeksi *P. berghei* ANKA), kelompok perlakuan 4 (diberikan ekstrak daun sirsak 200mg/KgBB/hari dan diinfeksi *P. berghei* ANKA).

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2014 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Inokulasi dilakukan pada hari ke 7 setelah pemberian ekstrak daun sirsak. Inokulasi *P. berghei* ANKA diberikan secara intraperitoneal sebanyak  $10^7$  parasit dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit. Ekstrak daun sirsak diberikan peroral melalui sonde dengan dosis 100mg/KgBB/hari dan 200mg/KgBB/hari setiap hari selama 14 hari. Masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke-14 dimatikan dan diambil limpanya dan dilakukan isolasi dan kultur limpa untuk diperiksa kadar TNF $\alpha$  dan NO dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immuno Assay*) dengan satuan pg/ml. Prosedur pemeriksaan kadar TNF $\alpha$  dari supernatan kultur sel limpa yang sudah ditambahkan dengan *Lipopolysacharida* (LPS) menggunakan ELISA Kit eBioscience no. Katalog BMS607/3/BMS607/3TEN sedangkan untuk pemeriksaan NO menggunakan kultur sel limpa yang sudah ditambahkan dengan *Phytohaemagglutinin* (PHA) dengan metode *Griess* diukur menggunakan *microplate reader* pada gelombang 595. Penelitian ini sudah mendapatkan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

## HASIL

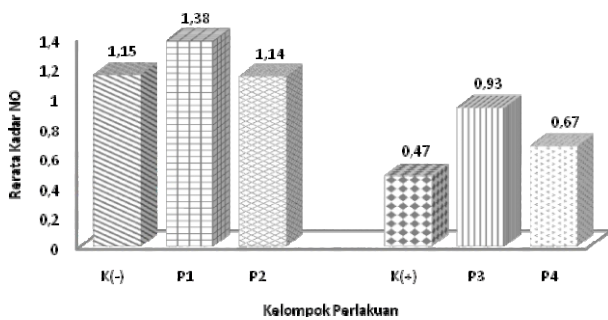
Kadar TNF- $\alpha$  diperoleh melalui pengukuran supernatan kultur limpa mencit yang distimulasi oleh LPS dengan menggunakan metode ELISA sedangkan kadar NO diperoleh dari supernatan kultur limpa mencit yang distimulasi PHA dan diukur menggunakan *microplate reader* pada gelombang 595. Jumlah rerata kadar TNF $\alpha$  dan NO pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rerata kadar TNF- $\alpha$  produk sel limpa yang distimulasi LPS

Pengamatan antar kelompok perlakuan yang sehat (P1 dan P2 yang masing-masing diberi ekstrak *Annona muricata* dosis 100 dan 200mg/KgBB/hari) didapatkan bahwa kadar TNF $\alpha$  lebih rendah pada kelompok P1 dibanding P2 (Gambar 1). Hal berbeda ditemukan pada kelompok perlakuan yang diinfeksi *P. berghei* ANKA (P3 dan P4 yang masing-masing menerima *Annona muricata* dosis

100 dan 200mg/KgBB/hari) yaitu kadar TNF $\alpha$  kelompok P3 lebih tinggi dibanding P4. Kelompok perlakuan yang diinokulasi *P. berghei* ANKA menunjukkan kadar TNF $\alpha$  lebih rendah pada kelompok P4 dibandingkan kelompok kontrol positif dan kelompok P3.



Gambar 2. Rerata Kadar NO produk sel limpa yang distimulasi PHA *in vitro*

Gambar 2 memperlihatkan bahwa kelompok perlakuan yang sehat yaitu K(+), P1 dan P2 didapatkan bahwa kadar NO lebih tinggi pada kelompok P1 dibandingkan dengan K(+) dan P2. Kelompok perlakuan yang diinokulasi *P. berghei* ANKA menunjukkan bahwa kadar NO kelompok kontrol positif lebih rendah dibandingkan kelompok P3 dan P4. Kelompok P3 lebih tinggi kadar NO dibanding dengan kelompok P4 dan kontrol positif.

Hasil statistik dengan uji *Bonferroni* menunjukkan bahwa kadar TNF $\alpha$  kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan 4 (P4) ( $p < 0,05$ ), sedangkan kelompok yang lain menunjukkan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ) (Gambar 1). Uji *Mann Whitney* menunjukkan bahwa kadar NO berbeda bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif, P1, dan P2, antara kelompok kontrol negatif dengan P4, P1 dengan P4, demikian pula dengan kelompok P2 dengan P4 ( $p < 0,05$ ) (Gambar 2). Kadar NO antar kelompok lainnya tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

## DISKUSI

Pada penelitian ini pemberian ekstrak daun *Annona muricata* pada kelompok dapat menurunkan rerata kadar TNF $\alpha$  pada kondisi terinfeksi *P. berghei* ANKA. Penurunan kadar TNF $\alpha$  kemungkinan diperantarai kandungan flavanoid yang ada pada daun sirsak. Flavanoid menyebabkan terjadinya penurunan kadar TNF $\alpha$  dikarenakan terjadinya stimulasi Th1 yang mengakibatkan

penurunan kadar IFN $\gamma$ , hal tersebut menyebabkan terjadinya penurunan stimulasi makrofak dalam memproduksi TNF $\alpha$  (10-12). Produksi TNF $\alpha$  yang rendah dapat menurunkan indeks parasitemia dan memperpanjang daya tahan hidup mencit (14,17). Produksi TNF $\alpha$  yang tinggi berhubungan dengan malaria yang berat, menyebabkan serebral malaria dan meningkatkan parasitemia serta organomegali (13,17).

Produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan seperti TNF- $\alpha$  menyebabkan meningkatnya regulasi ekspresi reseptor endotel seperti *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (7,15). Peran penting TNF- $\alpha$  dan ICAM-1 dalam mengganggu *blood-brain barrier* telah terbukti pada mencit yang diinokulasi *P. berghei* ANKA dengan cara *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1* (PfEMP-1) berikatan dengan ICAM-1 di permukaan pRBC menyebabkan *cytoadherence* pRBC dengan sel endotel otak (5,15,16). *Cytoadherence* tersebut dapat menyebabkan obstruksi pembuluh darah otak, iskemia, dan serebral malaria (5,16).

Penelitian ini juga mendukung adanya kecenderungan *Annona muricata* memodulasi kapasitas produksi NO sel limpa. Efek *Annona muricata* terlihat dari kadar NO kelompok P1 (penerima dosis 100 mg/KgBB/hari tanpa inokulasi) lebih tinggi dibanding kontrol negatif. Efek *Annona muricata* cenderung meningkatkan kadar NO mencit yang diinokulasi *P. berghei* ANKA. Hal ini dapat dilihat bahwa kadar NO pada kelompok yang diinokulasi *P. berghei* ANKA dan diberikan *Annona muricata* dosis 100 dan 200 mg/KgBB/hari lebih tinggi daripada kelompok kontrol positif.

Meningkatnya regulasi ekspresi reseptor endotel yang disebabkan oleh kadar TNF- $\alpha$  yang berlebihan akan menghasilkan NO (7). Kadar NO yang tinggi dapat membunuh parasit malaria pada stadium eritrosit dengan cara fagositosis parasit yang lebih kecil dan mensekresi faktor sitotoksik (15). Bioavailabilitas NO yang rendah berperan pada mencit dengan serebral malaria karena menyebabkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah, aliran darah dan oksigen otak sedikit (8). Kadar NO yang tinggi mampu membunuh parasit yang akan berkembang menjadi malaria serebral (9). Pemberian suplemen NO dari luar terbukti dapat mencegah kadar NO yang rendah dengan meningkatkan aliran darah, mencegah terjadinya vasokonstriksi, mencegah inflamasi pada pembuluh darah serta mengurangi perdarahan (8). Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun *Annona* efektif dapat menurunkan kadar TNF $\alpha$ , meningkatkan kadar NO pada mencit yang telah diinokulasi *P. berghei* ANKA yang mempunyai potensi perandalam pencegahan malaria serebral

## DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *World Malaria Report 2011*. Geneva, Switzerland: WHO; 2011.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Jakarta: Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan; 2011.
3. Sianny S dan Herni S. *Efek Anti Malaria Ekstrak Brotowali (Tinospora crispa) pada Mencit yang Diinfeksi Plasmodium berghei*. Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma. 2007; 1 (1) : 13 - 22.
4. Susy T dan Khie K. *Potensi Buah Merah Sebagai Antioksidan dalam Mengatasi Malaria Berghei pada Mencit Strain Balb/C*. Majalah Kedokteran Indonesia. 2010; 60(12): 571-575.
5. Schofield L and Grau GE. *Immunological Processes in Malaria Pathogenesis*. Nature Reviews Immunology. 2005; 5: 722-735.
6. Chen Q, Schlichtherle M, and Wahlgren M. *Molecular Aspect of Severe Malaria*. Clinical Microbiology Review. 2000; 13(3): 439-450.

7. Perera MK, Herath NP, Pathirana SL, *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. *Pathogens and Global Health*. 2013; 107(1): 21-29
8. Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, and Carvalho LJ. Nitric Oxide Protection Against Murine Cerebral Malaria is Associated with Improved Cerebral Microcirculatory Physiology. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011; 203(20): 1454-1463.
9. Newton CRJC, Hien TT, and White N. Cerebral Malaria. *Journal of Neurology, Neurosurgery, & Psychiatry*. 2000; 69: 433-441.
10. Fitri LE, Suhendwo W, Murwarni S, Muliarta IKG, dan Ali M. Effect of Combined Therapy Using Chloroquine and Vitamin C to The Peritoneal Macrophage Function in Balb/c Strain Mice Infected by *Plasmodium Berghei*. *Majalah Kedokteran Unibraw*. 2003; 19(3): 99-103.s
11. Mishra S, Ahmad S, Kumar N, and Sharma BK. *Annona muricata* (The Cancer Killer): A Review. *The Global Journal of Pharmaceutical Research*. 2013; 2(1): 1613-1618.
12. Syahida M, Maskat MY, Suri R, Mamot S, and Hadijah H. *Soursop (Annona muricata L.): Blood Hematology and Serum Biochemistry of Sprague-Dawley Rats*. *International Food Research Journal*. 2012; 19(3): 955-959.
13. Hanum PS, Hayano M, and Kojima S. Cytokine and Chemokine Responses in a Cerebral Malaria Susceptible or Resistant Strain of Mice to *Plasmodium Berghei* ANKA Infection: Early Chemokine Expression in the Brain. *International Immunology*. 2003; 15(5): 633-640.
14. Julius M, Rebecca W, Francis K, Zipporah N, Vivienne M, and Muregi FW. Cytokine Levels Associated with Experimental Malaria Pathology during *Plasmodium berghei* ANKA Infection in a Mouse Model. *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research*. 2013; 5(1): 1-8
15. Depinay N, Franetich JF, Grüner AC, *et al.* Inhibitory Effect of TNF $\alpha$  on Malaria Pre-erythrocytic Stage Development: Influence of Host Hepatocyte/Parasite Combinations. *PLoS One*. 2011; 6(3): 1-8.
16. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, and Doumbo OK. *The Pathogenic Basis of Malaria*. *Nature publishing group*. 2002; 415(6872): 673-679.
17. Kinra P and Dutta V. Serum TNF $\alpha$  Levels: A Prognostic Marker for Assessment of Severity of Malaria. *Tropical Biomedicine*. 2013; 30(4): 645-653
18. Clark IA, Alleva LM, Mills AC, and Cowden WB. Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions. *Clinical Microbiology Review*. 2004; 17(3): 509-539