

Pengaruh pemberian minyak biji mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) secara intravena terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit

Budi Mulyaningsih
Bagian Parasitologi
Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRACT

Budi Mulyaningsih - *The effect of intravenous neem's (Azadirachta indica A. Juss) seed oil on Plasmodium berghei in mice*

Background: Malaria is one of the most important public health problems in the tropical countries such as Indonesia. Several actions have been taken to overcome this problem, however, its prevalence is still high. Vector resistance to insecticide and parasite resistance to drug were two of the major constraints in dealing with malaria. Therefore, alternative methods to control malaria which are effective and safe are needed.

Objectives: To detect the effect of neem's (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil on *Plasmodium berghei* administered intravenously in mice.

Methods: Seventy five Swiss mice were divided into 7 groups and each group was treated intravenously with 50 mg/KgBW, 100 mg/KgBW, 200 mg/KgBW, 400 mg/KgBW, 500 mg/KgBW neem's seed oil; 5 mg/KgBW chloroquine and 50 ml physiological salt respectively for a period of 4 days after infection. The blood samples were collected every day (D₀ to D₊₃) from all experimental animals and the parasitemia were examined with Giemsa staining.

Results: Effective dose (ED₅₀) of neem's (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil on *Plasmodium berghei* in mice administered intravenously was 144.12 mg/Kg BW, and the inhibition effect of the dose of 800 mg/KgBW was 78.61%.

Conclusion: The neem's (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil on *Plasmodium berghei* administered intravenously in mice (800 mg/KgBW) has a potential inhibition effect on development of *P. berghei*.

Keywords: *Plasmodium berghei* - *Azadirachta indica* A. Juss - effective dose - parasitemia - resistance.

ABSTRAK

Budi Mulyaningsih - *Pengaruh pemberian minyak biji mimba (Azadirachta indica A. Juss) terhadap Plasmodium berghei pada mencit secara intravena.*

Latar belakang: Malaria hingga kini masih menjadi masalah kesehatan utama, khususnya di negara-negara tropik termasuk Indonesia. Pemberantasan malaria telah dilakukan dengan berbagai usaha, namun demikian prevalensinya masih tetap tinggi di berbagai tempat. Hal ini disebabkan antara lain oleh terjadinya resistensi vektor terhadap insektisida dan resistensi parasit terhadap obat malaria. Mengingat hal tersebut perlu dicari alternatif pengobatan lain yang efektif, aman, murah, dan mudah diperoleh di masyarakat.

Tujuan: Mengetahui pengaruh minyak biji mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap *Plasmodium berghei* yang diberikan secara intravena pada mencit sebagai hewan uji.

Bahan dan cara penelitian: Hewan uji (35 ekor mencit) dibagi menjadi 7 kelompok yang masing-masing kelompok diberi perlakuan minyak biji mimba dengan dosis 50 mg/Kg BB, 100 mg/Kg BB, 200 mg/Kg BB, 400 mg/Kg BB, 800 mg/Kg BB, klorokuin 5 mg/KgBB dan 50 ml gram fisiologis. Pemberian obat dilakukan

secara intravena selama 4 hari berturut-turut dimulai dari inokulasi parasit. Pemeriksaan parasitemia dilakukan setiap hari sampai hari keempat (D_{+0} sampai D_{+3}) dengan cara dibuat sediaan darah tipis yang dicat dengan Giemsa.

Hasil: Dosis minyak biji mimba sebesar 800 mg/Kg BB mempunyai pengaruh penghambatan (inhibisi) sebesar 78,61% dan klorokuin 5 mg/Kg BB mempunyai pengaruh penghambatan sebesar 92,31%. Nilai ED_{50} minyak biji mimba yang diberikan intravena adalah 144,12 mg/Kg BB.

Simpulan. Minyak biji mimba yang diberikan intravena dengan dosis 800 mg/Kg BB mempunyai pengaruh penghambatan yang cukup besar pada pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei*.

(B.I.Ked. Vol. 33, No. 2: 71-76, 2001)

PENGANTAR

Malaria hingga saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang penting di Indonesia. Daerah endemis malaria hampir terdapat di semua propinsi, walaupun dengan tingkat endemisitas yang berbeda-beda dan daerah Indonesia Bagian Timur merupakan daerah malaria yang terberat. Malaria di Jawa terdapat di daerah Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan daerah pantai Selatan Jawa Barat.^{1,2,3}

Sejak dahulu pemberantasan malaria telah dilakukan dengan berbagai usaha, namun demikian prevalensinya masih tetap tinggi di berbagai tempat. Hal ini disebabkan oleh terjadinya resistensi vektor terhadap insektisida dan resistensi parasit terhadap obat malaria terutama klorokuin², dan pada tahun 1985 fokus *Plasmodium falciparum* yang telah resisten terhadap klorokuin telah ditemukan di seluruh propinsi di Indonesia kecuali Jambi, Bengkulu dan Yogyakarta.⁴ Menurut Arbani³ sejak tahun 1992 seluruh propinsi di Indonesia telah melaporkan terjadinya resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin. Di samping itu juga dilaporkan bahwa telah terjadi resistensi *Plasmodium vivax* terhadap klorokuin di Pulau Nias dan Irian Jaya. Menurut Noerhayati, di Indonesia ditemukan 4 spesies penyebab malaria yaitu *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) dan *Plasmodium ovale* (*P. ovale*)⁵ Di antara 4 macam parasit malaria tersebut yang paling banyak ditemukan adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*. Adapun *P. malariae* terdapat tersebar tidak merata dan jarang ditemukan di Pulau Jawa, sedangkan *P. ovale* ditemukan di Owi yaitu suatu pulau dekat Biak, Irian Jaya dan ada satu kasus yang pernah dilaporkan di Timor Timur.⁶

Mengingat masalah tersebut di atas, maka perlu dicari alternatif pengobatan lain yang berkhasiat, aman, dan mudah diperoleh di masyarakat. Sampai saat ini sudah banyak tanaman obat yang diteliti dan ternyata mengandung bahan-bahan yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *Plasmodium sp.* Penelitian yang dilakukan oleh Hadianto *et al.* menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba yang diberikan secara oral, subkutan maupun intravena mempunyai efek sebagai penghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *Plasmodium sp.* *in vivo*.⁷ Menurut Rochanakij *et al.* ekstrak daun mimba dapat berefek sebagai antimalaria.⁸

Menurut Hegnauer zat pahit (solanin, nimbodin, nimbinin, nimbidol dan nimbin) yang merupakan kandungan kimia utama dari suatu tanaman mimba terdapat paling banyak di dalam bijinya.⁹ Dari hasil ekstraksi biji mimba diperoleh 3 macam fraksi, yaitu fraksi minyak, fraksi lemak dan fraksi air, adapun dari ketiga fraksi tersebut yang paling banyak adalah fraksi minyaknya. Dari percobaan pendahuluan diketahui bahwa yang mempunyai potensi menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* adalah fraksi minyaknya. Menurut Mulyaningsih & Sudarsono minyak biji mimba yang diberikan peroral dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* dengan harga ED_{50} sebesar 973,93 mg/Kg BB.¹⁰ Oleh karena itu muncul suatu permasalahan yang menarik untuk dipecahkan, yaitu apakah minyak biji mimba yang diberikan secara intravena dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* lebih kuat jika dibandingkan dengan pemberian peroral.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi untuk mengembangkan obat tradisional sehingga dapat dimanfaatkan berdasarkan landasan ilmiah dan untuk memperkaya khasanah ilmu pengetahuan khususnya di bidang pengobatan malaria dengan obat tradisional.

BAHAN DAN CARA

Bahan uji pada penelitian ini adalah biji mimba yang diperoleh dari pohon mimba yang banyak tumbuh di daerah Jawa Timur. Ekstraksi untuk memperoleh fraksi minyak dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Obat Tradisional (PPOT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Biji mimba dikupas kulitnya, ditambah etanol dan diblender selama 5 menit dan ditekan dengan mesin pengepres, hasilnya yang berupa cairan ditampung dengan corong Buchner sehingga diperoleh filtrat 1. Residu pengepresan diekstraksi kembali dengan etanol sebanyak 2 kali sehingga diperoleh filtrat 2 dan 3. Hasil filtrasi dicampur, dievaporasi dengan alat *Rotary evaporator* pada suhu 40° C. Minyak yang diperoleh dipisahkan dari asam lemak dan lemak tumbuhan dengan proses penyabunan menggunakan KOH dalam etanol 70%.

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *in vivo* pada hewan coba yang diperlakukan menurut cara dari Peters, yaitu percobaan dilakukan selama 4 hari (*four days test*), dan uji statistik dari data yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan analisis varian satu jalan dan dilanjutkan dengan uji antar kelompok perlakuan dengan Tukey's HSD test^{11,12}. Penelitian *in vivo* ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM.

Hewan coba yang dipakai adalah mencit jenis *Swiss jantan* dengan berat 20-30 gram dan umur

1,5 - 2,5 bulan sebanyak 35 ekor yang telah diinokulasi dengan *Plasmodium berghei* pada hari pertama penelitian (D₊₀).

Subyek penelitian dibagi menjadi 7 kelompok secara acak (tiap kelompok terdiri atas 5 ekor mencit), yaitu 1 kelompok kontrol negatif (garam fisiologis 50 ml/ekor/hari), 1 kelompok pembanding (klorokuin 5 mg/Kg BB/hari) dan 5 kelompok perlakuan minyak biji mimba dengan variasi dosis yang diberikan sebesar 50, 100, 200, 400 dan 800 mg/Kg BB/hari. Pemberian minyak biji mimba, klorokuin dan garam fisiologis secara intravena melalui vena di bagian ekor dan dilakukan selama 4 hari sejak hari diinokulasi dengan *Plasmodium berghei* (sejak D₊₀ sampai D₊₃). Sediaan apus darah tipis dibuat dengan cara darah diambil dari ujung ekor mencit, dan dilakukan setiap hari untuk diperiksa parasitemianya sampai hari D₊₄. Hasil pengamatan parasitemia digambarkan dalam hubungan dengan tingginya dosis pada kertas log-probit sehingga dapat dibuat garis regresi dan ditentukan nilai ED₅₀nya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data pemeriksaan parasitemia pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada TABEL 1.

Untuk lebih jelasnya perkembangan parasitemia pada masing-masing kelompok selama waktu pengamatan, yaitu 4 hari berturut-turut dapat dilihat pada GAMBAR 1.

TABEL 1. -Rerata persentase parasitemia masing-masing kelompok pada pemberian obat intravena setiap hari selama 4 hari berturut-turut

Perlakuan	Parasitemia (%)			
	hari - 1	hari - 2	hari - 3	hari - 4
Kontrol negatif (a)	4,84±0,15	8,77±0,19	31,37±0,34	47,07±0,59
mimba - 50	6,94±0,30	9,23±1,24	19,34±1,65	33,81±1,32
mimba - 100	4,33±0,31	7,34±1,54	16,52±1,12	26,09±0,92
mimba - 200	2,98±2,13	5,32±1,32	13,43±1,76	18,53±0,54
mimba - 400	2,44±1,21	4,17±0,98	11,62±1,74	16,62±0,13
mimba - 800	1,38±0,45	2,17±0,55	6,13±1,46	10,07±0,18
Pembanding (b)	0,00±0,00	0,23±0,44	0,87±0,58	1,39±0,53

Keterangan :

a. Larutan garam fisiologis ; b. Klorokuin 5 mg/Kg BB

Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Peters, pada penelitian ini data yang diolah untuk pengambilan kesimpulan adalah data parasitemia pada hari keempat.¹¹

TABEL 2. -Rerata persentase parasitemia masing-masing kelompok pada hari ke-4 dengan pemberian obat intravena setiap hari

Perlakuan	Parasitemia (%)
Kontrol negatif (a)	47,07±0,59
mimba - 50	33,81±1,32
mimba - 100	26,09±0,92
mimba - 200	18,53±0,54
mimba - 400	16,62±0,13
mimba - 800	10,07±0,18
Pembanding (b)	1,39 ± 0,53

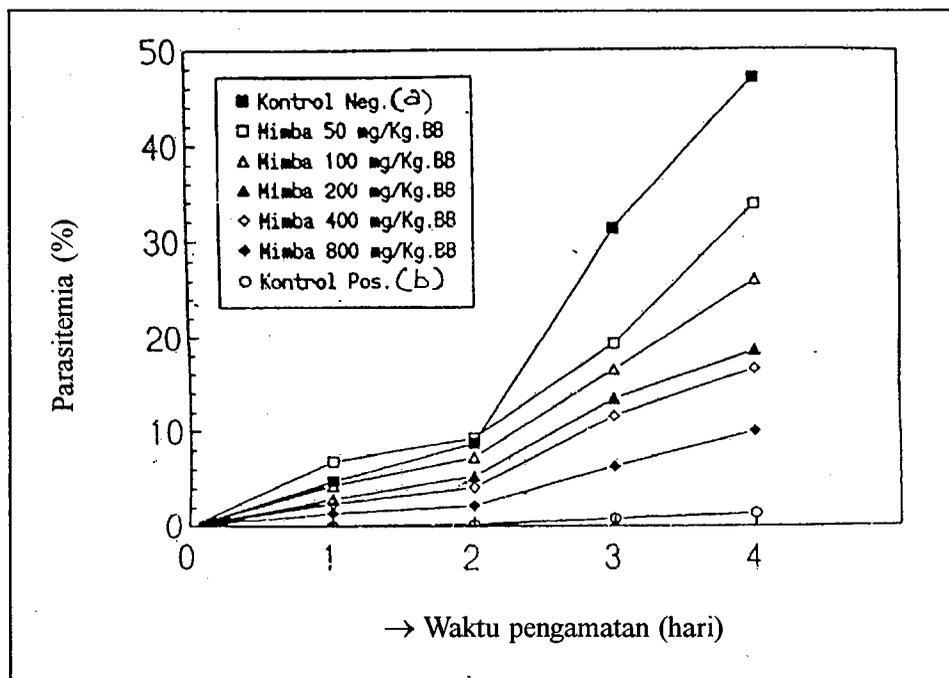
Keterangan :

- a. Larutan garam fisiologis
- b. Klorokuin 5 mg/Kg BB

Berdasarkan uji statistik dengan menggunakan analisis varians satu jalan ternyata perbedaan parasitemia pada masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke-4 hasilnya sangat bermakna ($p < 0,01$).

Setelah dilanjutkan dengan uji antar kelompok perlakuan dengan Tukey's HSD test ternyata bahwa:

1. Parasitemia pada kelompok pembanding lebih rendah daripada kelompok (1) mimba-800; (2) mimba-400; (3) mimba-200; (4) mimba-100; dan (5) mimba-50 dan masing-masing berbeda bermakna secara statistik ($p < 0,01$).
2. Parasitemia pada kelompok mimba-800 lebih rendah daripada kelompok (1) mimba-400; (2) mimba-200; (3) mimba-100; (4) mimba-50; dan (5) kelompok kontrol negatif, dan masing-masing juga berbeda bermakna secara statistik ($p < 0,01$).
3. Parasitemia pada kelompok mimba-400 lebih rendah daripada kelompok (1) mimba-200; (2) mimba-100; (3) mimba-50; dan (4) kontrol negatif, yang kesemuanya secara statistik bermakna ($p < 0,05$).
4. Parasitemia pada kelompok mimba-100 lebih rendah daripada kelompok kontrol negatif dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), sedangkan terhadap



GAMBAR 1. Perkembangan parasitemia pada masing-masing kelompok dengan cara pemberian obat intravena.

kelompok mimba-50 meskipun juga lebih rendah, tetapi tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$).

5. Parasitemia pada kelompok mimba-50 lebih rendah daripada kelompok kontrol negatif dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).
6. Parasitemia pada kelompok mimba-200 lebih rendah daripada kelompok (1) mimba-100; (2) mimba-50; dan (3) kontrol negatif. Kesemuanya juga secara statistik bermakna yaitu masing-masing dengan $p < 0,05$, $p < 0,05$ dan $p < 0,01$.

Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa minyak biji mimba yang diberikan secara intravena yang mempunyai efek menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* secara bermakna dimulai pada dosis 50 mg/KgBB, namun efek penghambatan dari dosis tertinggi dalam penelitian ini yaitu 800 mg/KgBB masih lebih kecil dibandingkan dengan efek penghambatan dari klorokuin dengan dosis 5 mg/KgBB.

Untuk mengetahui hubungan dosis minyak biji mimba yang diberikan intravena dengan efeknya terhadap pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* perlu diamati pula persentase inhibisi parasitemia pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (TABEL 3).

TABEL 3. – Hubungan antara dosis dan efek minyak biji mimba yang diberikan secara intravena terhadap *P. berghei* pada mencit

Dosis mimba (mg/Kg)	Parasitemia tiap perlakuan	Parasitemia kontrol negatif	Persentase inhibisi
50	33,81	47,07	28,17
100	26,09	47,07	44,57
200	18,53	47,07	60,63
400	16,62	47,07	64,69
800	10,07	47,07	78,61

Dari data tersebut dapat dilihat semakin tinggi dosis minyak biji mimba yang diberikan semakin besar pula efek penghambatan (inhibisi) pada pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei*. Setelah dilakukan perhitungan ternyata nilai ED_{50} dari minyak biji mimba yang diberikan secara intravena adalah sebesar 144,12 mg/Kg BB.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rochanakij *et al.* dilaporkan bahwa ekstrak air daun mimba yang diberikan secara subkutan dengan dosis 93 mg/KgBB dapat menghambat persentase parasitemia, namun demikian secara statistik efek penghambatan tersebut tidak bermakna.⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Hadianto *et al.* menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba yang diberikan baik peroral, subkutan, maupun intravena dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* pada mencit. Pemberian ekstrak daun mimba dengan cara intravena memberi efek penghambatan yang paling besar dibandingkan dengan subkutan dan peroral.⁷ Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mulyaningsih & Sudarsono menunjukkan bahwa ED_{50} minyak biji mimba yang diberikan peroral adalah sebesar 973,93 mg/Kg BB¹⁰. Hal ini menunjukkan bahwa minyak biji mimba yang diberikan secara intravena lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* dibandingkan dengan pemberian peroral. Hasil tersebut juga menunjukkan adanya perbedaan yang dipengaruhi oleh cara pemberian obat. Menurut Gan pada pemberian obat peroral lebih banyak faktor yang mempengaruhi bioavailabilitas obat tersebut, termasuk kemungkinan obat yang diberikan ikut mengalami metabolisme dalam saluran pencernaan sehingga dapat mengurangi jumlah obat yang diabsorpsi atau yang mencapai sirkulasi sistemik¹³. Pada pemberian secara intravena obat tidak mengalami tahap absorpsi sehingga dapat memberi efek lebih cepat dan tepat.

Untuk mengetahui sampai sejauh mana potensi minyak biji mimba sebagai antimalaria, maka pada penelitian ini dibandingkan dengan daya hambat klorokuin terhadap pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei*. Dari hasil penelitian ini dapat dilihat persentase inhibisi minyak biji mimba dengan dosis 800 mg/Kg BB yang diberikan secara intravena adalah sebesar 78,61%, persentase inhibisi klorokuin dengan dosis 5 mg/KgBB yang diberikan secara intravena adalah sebesar 92,31%. Perlu dijelaskan di sini bahwa bahan aktif dari biji mimba yang digunakan masih merupakan campuran dari beberapa zat yang efeknya masing-masing belum diketahui secara pasti, sedangkan klorokuin yang digunakan sebagai pembanding adalah klorokuin murni, yang sudah dipastikan efektif sebagai antimalaria.

Dari hasil penelitian ini terlihat adanya kemungkinan pengembangan minyak biji mimba sebagai obat alternatif antimalaria, namun demikian menurut Reksohadiprodjo penelitian-penelitian yang diperlukan untuk hal itu masih harus melalui beberapa tahapan lagi termasuk penelitian mengenai toksisitas dan efek sampingnya pada mencit.¹⁴

SIMPULAN

1. Efek minyak biji mimba dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* pada mencit.
2. Semakin tinggi dosis minyak biji mimba yang diberikan semakin kuat efeknya dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan *P. berghei* pada mencit.
3. Harga ED₅₀ minyak biji mimba yang diberikan secara intravena sebesar 144,12 mg/Kg BB.
4. Persentase inhibisi minyak biji mimba dengan dosis 800 mg/Kg BB yang diberikan secara intravena sebesar 78,61%, sedangkan persentase inhibisi klorokuin dengan dosis 5 mg/KgBB yang diberikan secara intravena sebesar 92,31%.

SARAN

1. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk (1) mengetahui bentuk sediaan minyak yang cocok yang dapat diberikan dalam bentuk injeksi, dan (2) untuk mengetahui efek minyak biji mimba terhadap bentuk-bentuk stadium *P. berghei* dalam darah mencit (bentuk-bentuk stadium dalam siklus aseksual).
2. Perlu dilakukan beberapa tahapan penelitian lagi untuk mengetahui apakah minyak biji mimba dapat digunakan sebagai antimalaria secara aman.

KEPUSTAKAAN

1. Oemijati S. Penelitian Pemberantasan Malaria. obat-obat Malaria. MKI.1992; 42(3): 155-62.
2. Arbani. Rencana Pemberantasan malaria di Indonesia menjelang tahun 2000. Cermin Dunia Kedokteran, 1991.
3. Sungkar S. & Pribadi W. Resistensi *Plasmodium falciparum*. Simposium Malaria, Jakarta. 1994.
4. Soepanto A. Pemberantasan malaria di Indonesia pada Pelita IV, Cermin Dunia Kedokteran 1989; 54: 3-6.
5. Noerhayati S. Penyakit Parasit Khususnya Malaria dan Filariasis dan Dampaknya terhadap Kesehatan Masyarakat di Indonesia. Seminar Parasitologi, Yogyakarta. 1989.
6. Noerhayati S. Pemberantasan Penyakit Parasitik pada Manusia di Jawa Tengah dan DIY, serta Permasalahannya. Seminar Regional Parasitologi, Salatiga. 1990.
7. Hadianto T, Noerhayati S dan Soesanto T. Pengaruh ekstrak daun mimba terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit. BPPS-UGM, 1995 ; 8 (1B).
8. Rochanakij S, Thebtaranonth Y, Yenjai C, & Yuthavong Y. Nimbolide. A Constituent of *Azadirachta indica*, Inhibits *Plasmodium falciparum* in culture, Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 1985; 16 (1) : 66-72.
9. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen, 5. Bande, Birkhauser Verlag Basel. 1969. pp. 61-9.
10. Mulyaningsih B. dan Sudarsono. Penentuan Aktivitas Antimalaria Zat Aktif yang Terkandung dalam Biji *Azadirachta indica* A. Juss pada Hewan Uji Mencit (Swiss mice). Laporan Penelitian No. UGM/4133/J.01.P/PL.06.05/98. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada. 1999.
11. Peters W. Techniques for The Study of Drug Response in Experimental Malaria. Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria. New York: Academic Press, 1970.
12. Daniel WW. Biostatistic: A foundation for Analysis in the Health Sciences, 4th ed. New York: John Wiley & Sons. 1987.
13. Gan S. Farmakologi dan Terapi, Bagian Farmakologi FK-UI, Jakarta, 1987.
14. Reksohadiprodjo MS. Peranan kimia medisinal dalam tanaman obat tradisional suatu produk alam, Phyto Medica, 1989; 1(1): 65-8.