

## Efek Ekstrak Daun *Azadirachta indica* terhadap Kadar Transforming Growth Factor- $\beta$ dan Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*

### *The Effect of Azadirachta indica leaves extract on Transforming Growth Factor- $\beta$ and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in a Plasmodium berghei infected Mice model.*

Zainabur Rahmah

Departemen parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
e-mail korespondensi: zainabur.rahmah@kedokteran.uin-malang.ac.id

#### Abstrak

Malaria merupakan masalah kesehatan penduduk dunia dan mayoritas berada di daerah tropis dan subtropis. Tiga negara dengan kasus malaria terbanyak adalah India (58%), disusul Indonesia (20%), lalu Myanmar (16%). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun *Azadirachta indica* terhadap peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  dan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Pada penelitian ini terdapat empat kelompok yaitu Perlakuan 1 (di infeksi *Plasmodium berghei* tanpa di terapi). Perlakuan 2 (di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi ekstrak daun *Azadirachta indica* dengan dosis 0,25 mg / gr BB). Perlakuan 3 = ( di infeksi *Plasmodium berghei* dan di terapi dengan daun *Azadirachta indica* dengan dosis 0,5 mg / gr BB). Perlakuan 4 = (di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dengan dosis 1 mg / gr BB). Pemeriksaan TGF- $\beta$  dengan metode elisa dan TNF- $\alpha$  dengan imunohistokimia. Analisis data menggunakan SEM (*Structural Equation Modelling*). Hasil perlakuan 1 dan 2 menunjukkan penurunan ekspresi TGF- $\beta$  plasma ( $t_{hitung} = 1,13$ ;  $t_{hitung} = 1,93$ ;  $\geq t_{tabel} = 1,96$ ) dan limpa ( $t_{hitung} = 1,53$ ;  $t_{hitung} = 1,45$ ;  $\geq t_{tabel} = 1,96$ ) tetapi terjadi peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  limpa ( $t_{hitung} = 1,77$ ;  $t_{hitung} = 1,00$ ;  $\geq t_{tabel} = 1,96$ ). Pada kelompok 3 dan 4 menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  plasma ( $t_{hitung} = 5,13$ ;  $t_{hitung} = 2,42$ ;  $\geq t_{tabel} = 1,96$ ) dan limpa ( $t_{hitung} = 2,00$ ;  $t_{hitung} = 1,97$ ;  $\geq t_{tabel} = 1,96$ ) tetapi terjadi penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  limpa ( $t_{hitung} = 2,03$ ;  $t_{hitung} = 2,11$ ;  $\geq t_{tabel} = 1,96$ ). Kesimpulan: Terapi daun *Azadirachta indica* dapat meningkatkan ekspresi TGF- $\beta$  dan menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada limpa.

**Kata kunci:** Ekstrak etanol 96% *Azadirachta indica*, *Plasmodium berghei*, transforming growth factor-  $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

#### Abstract

Malaria is a health problem for the world's population and is predominantly located in tropical and subtropical areas. The three countries with the most malaria cases are India (58%), followed by Indonesia (20%), then Myanmar (16%). This study aims to determine the effect of neem leaf extract on increasing TGF- $\beta$  expression and decreasing TNF- $\alpha$  expression in mice infected with *Plasmodium berghei*. In this study there were four groups, namely Treatment 1 (in *Plasmodium berghei* infection without therapy). Treatment 2 (in *Plasmodium berghei* infection and treated with *Azadirachta indica* leaf extract at a dose of 0.25 mg / g BW). Treatment 3 = (in *Plasmodium berghei* infection and therapy with *Azadirachta indica* leaves at a dose of 0.5 mg / g BW). Treatment 4 = (in *Plasmodium berghei* infection and treated with *Azadirachta indica* leaves at a dose of 1 mg / g BW). TGF- $\beta$  examination by elisa method and TNF- $\alpha$  by immunohistochemistry. Data analysis using SEM (*Structural Equation Modeling*) The results of treatment 1 and 2 showed a decrease in plasma TGF- $\beta$  expression ( $t = 1.13$ ;  $t_{count} = 1.93$ ;  $\geq t_{tabel} = 1.96$ ) and spleen ( $t_{count} = 1.53$ ;  $t_{count} = 1.45$ ;  $\geq t_{tabel} = 1.96$ ) but there was an increase in spleen TNF- $\alpha$  expression ( $t_{count} = 1.77$ ;  $t_{count} = 1.00$ ;  $\geq t_{tabel} = 1.96$ ). Groups 3 and 4 showed an increase in plasma TGF- $\beta$  expression ( $t_{count} = 5.13$ ;  $t_{count} = 2.42$ ;  $\geq t_{tabel} = 1.96$ ) and spleen ( $t_{count} = 2.00$ ;  $t_{count} = 1.97$ ;  $\geq t_{tabel} = 1.96$ ) but there was a decrease in spleen TNF- $\alpha$  expression ( $t_{count} = 2.03$ ;  $t_{count} = 2.11$ ;  $\geq t_{tabel} = 1.96$ ). Conclusion: *Azadirachta indica* leaf therapy can increase TGF- $\beta$  expression and decrease TNF- $\alpha$  expression in the spleen.

**Keywords:** *Azadirachta indica* ethanol extract, transforming growth factor-  $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$

## Pendahuluan

Selama satu abad pemberantasan malaria, parasit penyebab malaria belum bisa dibasmi sepenuhnya. Perhitungan kasar menunjukkan terdapat 216 juta dan 445.000 juta kematian (laporan WHO 2018). *Annual Parasite Incidence* (API) di Indonesia di tahun 2015 menunjukkan angka 0,85. Walaupun Tren API mengalami penurunan sejak tahun 2011 namun beberapa daerah terutama Indonesia bagian timur masih memiliki angka API yang sangat tinggi melebihi API nasional (Kemenkes, 2012).

Selama infeksi malaria terjadi aktivasi sistem imun non spesifik dan spesifik yang dipengaruhi oleh keberadaan parasit dan produksi glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Muthusamy *et al.*, 2004). *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) adalah sitokin pro-inflamasi yang pada prinsipnya diproduksi oleh sel imun yang teraktivasi seperti makrofag, sel T CD4+, sel B, dan sel mast (Gimenez *et al.*, 2003), juga memiliki peran ganda dalam patogenesis malaria (Leão *et al.*, 2020). kasus malaria cerebral fase awal terjadi peningkatan TNF- $\alpha$  berkaitan dengan pengurangan dari derajat parasitemia. Namun, produksi TNF- $\alpha$  yang berlebihan pada fase akhir dikaitkan dengan keparahan penyakit malaria akibat beratnya kerusakan jaringan yang terjadi (Irawati, 2014).

Respon sitokin Th-1 yang ekspresinya yang tinggi merangsang limfosit untuk menghasilkan sitokin Th-2 seperti IL-10 yang memiliki efek immuno-regulator dan dapat menekan dominasi Th-1 (Suguitan, 2003, Saito, 2010). Peningkatan ekspresi sitokin Th-2 biasanya dikaitkan dengan ekspresi tinggi dari regulasi sitokin T yang meningkat seperti *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ ) yang berfungsi untuk menghilangkan parasit (Calleja-Agius & Brincat, 2008). Berbagai upaya pemberantasan malaria telah dilakukan namun prevalensinya tetap tinggi akibat resistensi parasit dan *Plasmodium* menghasilkan strain baru yang resisten terhadap obat yang ada (Silver *et al.*, 2010).

Obat anti malaria adalah kunci untuk pengendalian dan pemberantasan dari malaria (Cui *et al.*, 2015). Sejak tahun 2004, terapi kombinasi Artemisinin (*Artemisinin Combination*

*Therapy*-ACT) telah menjadi terapi utama malaria. Saat ini seluruh kelas obat antimalarial telah terbentuk resistensi, kecuali Artemisinin, jika resistensi juga terbentuk pada Artemisinin, kita mungkin akan menghadapi malaria yang tidak dapat diobati. Penelitian menggunakan kombinasi Artemisinin dengan ekstrak tanaman yang mengandung Flavonoid memberikan hasil yang lebih efektif dalam menurunkan jumlah parasit karena akan meningkatkan kinerja Artemisinin. Hal ini membuktikan ekstrak tanaman yang mengandung Flavonoid dapat dijadikan pengobatan pendamping obat utama (Veronica, dkk. 2020; White NJ, 2004).

## Metode Penelitian

1. Desain penelitian  
Studi laboratorium eksperimental in vivo ini dilakukan dengan membandingkan data yang diperoleh dari empat kelompok mencit BALB/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Dalam penelitian ini dibagi menjadi empat kelompok yaitu: (A), kelompok kontrol (n = 6) yaitu mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diberi perlakuan ekstrak daun *Azadirachta indica*. (B), Mencit pada infeksi *Plasmodium berghei* (n = 6), diberi ekstrak daun *Azadirachta indica* dengan dosis 0,25 mg/grBB. (C), kelompok Mencit pada infeksi *Plasmodium berghei* (n = 6), diberi perlakuan ekstrak daun mimba dengan dosis 0,5 mg/grBB. (D), kelompok mencit pada infeksi *Plasmodium berghei* (n = 6), diberi perlakuan ekstrak daun *Azadirachta indica* dengan dosis 1 mg/grBB. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Sampel penelitian  
Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan BALB/C dengan bobot 25-30 gram dengan umur 15-16 minggu.
3. Pembuatan Ekstrak daun *Azadirachta indica*  
Daun *Azadirachta indica* 30 gram di maserasi dengan etanol 96% sebanyak 300 ml selama 3 hari kemudian disaring dipisahkan filtrat dengan ampas, filtrat dievaporasi menggunakan alat rotavapor sampai pelarut

- menguap habis selama 30 menit dan didapatkan ekstrak sebanyak 14 gram.
4. Inokulasi *Plasmodium berghei* galur ANKA untuk Mencit  
Inokulasi *Plasmodium berghei* galur ANKA untuk mencit donor dilakukan dengan menginokulasikan *Plasmodium berghei* galur ANKA (hasil *thawing* dari liquid nitrogen) secara intraperitoneal ke mencit donor, kemudian setelah hari ke-4 setelah inokulasi, dilakukan penghitungan parasitemia.
  5. Isolasi sitokin dari limpa  
Jaringan limpa dihomogenisasi dua kali volume 0,1 M larutan garam dengan buffer Tris (pH7,4) yang mengandung 0,5% Triton X-100 dan 1 tablet koktail PI Mini Lengkap 10 ml (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 menit, supernatan dikumpulkan dan diukur konsentrasinya.
  6. Pemeriksaan Kadar TGF- $\beta$  Plasma dan Limpa  
Kadar TGF- $\beta$  di periksa dari sampel plasma dan jaringan limpa dengan metode *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA) dengan satuan pg/ml menggunakan (Mouse TGF-Beta Elisa Kit, No katalog E0285Mo).
  7. Deteksi ekspresi TNF- $\alpha$  di limpa  
Ekspresi TNF- $\alpha$  di limpa diukur dengan imunohistokimia dengan monoklonal TNF- $\alpha$  Ab (Santa cruz, sc-54661 TNF- $\alpha$ ). Setelah semua slide diamati, dihitung jumlah rata-rata ekspresi sel TNF- $\alpha$  pada setiap kelompok. Slide diamati di bawah mikroskop dengan

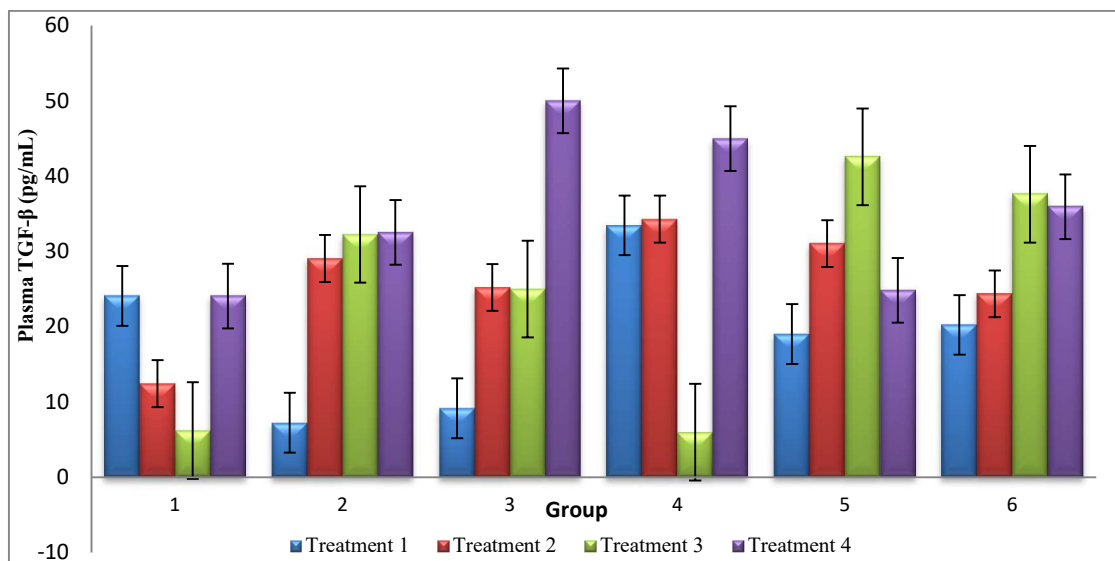
- perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi. Setiap slide diamati di bawah 20 bidang pandang dan mencatat jumlah TNF- $\alpha$  yang diekspresikan. Ekspresi TNF- $\alpha$  terdeteksi berwarna coklat di sel intraseluler dan ekstraseluler yang terakumulasi di jaringan limpa.
8. Analisis data  
Analisis data menggunakan *Structural Equation Modeling* (SEM) non parametrik dengan *true tool software Smart Partial Least Square* (PLS) di sebabkan karena sampel kurang dari 100, penelitian memakai nilai kepercayaan  $p = 0,05$  di katakan bermakna apabila nilai T hitung  $\geq 1,96$ .
  9. Etika Penelitian  
Penelitian ini sudah mendapat *ethical clearance* dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang dengan nomer Surat Pernyataan Laik Etik (No.009/EC/ KEPK-FKIK / 2018).

### Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit kemudian dibagi menjadi empat kelompok perlakuan. Setiap perlakuan terdiri dari 6 mencit.

#### 1. Tingkat TGF- $\beta$ plasma

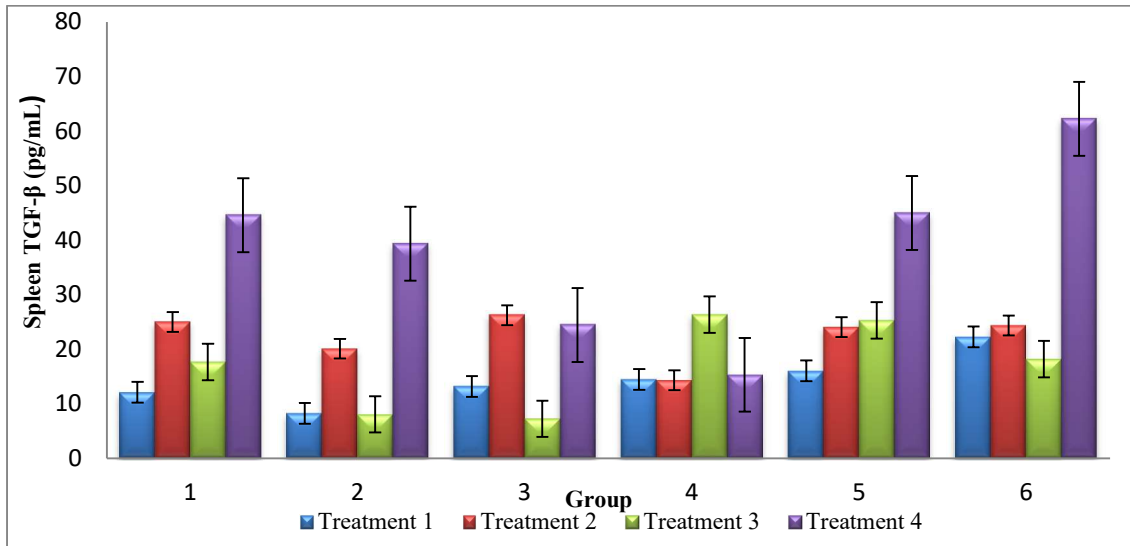
Kadar TGF- $\beta$  plasma divisualisasikan menggunakan diagram batang di setiap kelompok dan ditampilkan seperti Gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik yang menunjukkan kadar TGF- $\beta$  plasma hari ke-9 (pg/mL) setelah infeksi, Perlakuan 1 = (terinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa terapi. Rata-rata $\pm$ SD:18,87  $\pm$  5,67). Perlakuan 2 = (di infeksi *Plasmodium*

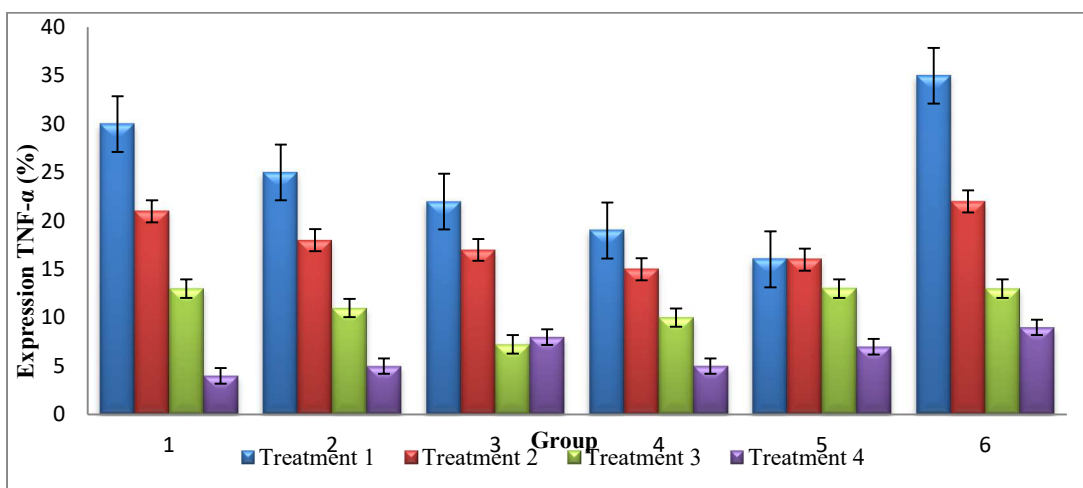
*berghei* dan di terapi dengan daun *Azadirachta indica* dosis 0,25 mg/grBB. Rata-rata ± SD: 26,07±6,78). Perlakuan 3 = ( di infeksi *Plasmodium berghei* dan di terapi dengan daun *Azadirachta indica* dosis 0,5 mg/grBB. Rata-rata± SD: 27,18 ± 11,08). Perlakuan 4 = ( di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dosis 1 mg/grBB. Rata-rata ± SD 28,33 ± 56,66).

2. Kadar TGF-β di Limpa menggunakan diagram batang di setiap kelompok dan ditunjukkan seperti Gambar 2.  
 Kadar TGF-β di limpa divisualisasikan



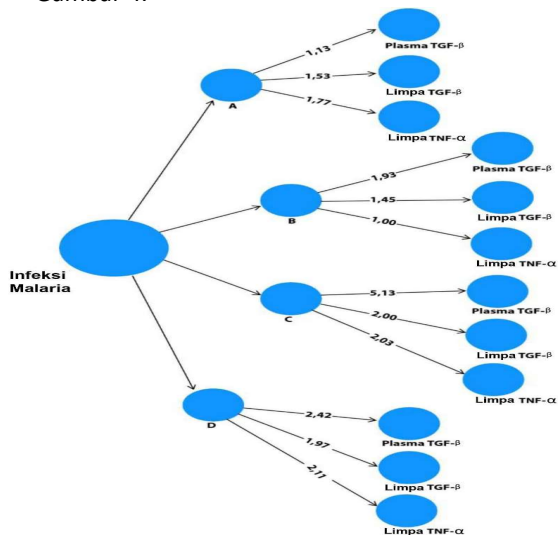
**Gambar 2.** Grafik yang menunjukkan kadar TGF-β limpa hari ke-9 (pg/mL) setelah infeksi Perlakuan 1 =(terinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diterapi. Rata-rata ±SD:14,37±4,66). Perlakuan 2 = ( di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dosis 0,25 mg/gr BB. Rata-rata ± SD: 22,34±9,95). Perlakuan 3 = (di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dosis 0,5 mg/gr BB. Rata-rata ± SD: 17,13 ± 8,23). Perlakuan 4 = (di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dosis 1 mg / gr BB. Rata-rata ± SD 38,48 ± 16,38).

3. Ekspresi TNF-α di limpa pada masing-masing kelompok dan Ekspresi TNF-α pada limpa divisualisasikan dengan menggunakan diagram batang ditunjukkan pada Gambar 3.



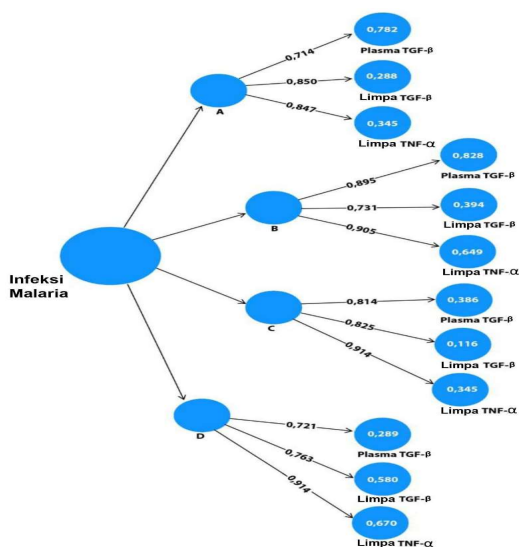
**Gambar 3:** Grafik yang menunjukkan ekspresi TNF-α pada jaringan limpa hari ke-9 setelah infeksi. Pengobatan 1 =(diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diterapi). Perlakuan 2 = ( di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dengan dosis 0,25 mg/gr BB). Perlakuan 3 = (di infeksi *Plasmodium berghei* dan di terapi dengan daun *Azadirachta indica* dengan dosis 0,5 mg / gr BB). Perlakuan 4 = (di infeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi dengan daun *Azadirachta indica* dengan dosis 1 mg / gr BB).

Analisis dan perhitungan data dilakukan dengan menggunakan Struktural Equation Modeling (SEM) Non Parametrik. Hasilnya disajikan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Structural Equation Modeling (SEM) untuk Menentukan Signifikansi Hubungan Kadar TGF-β Plasma, Kadar TGF-β di Limpa, dan Ekspresi TNF-α di Limpa.

Model hipotesis hubungan antara kadar TGF-β plasma, kadar TGF-β di limpa, dan ekspresi TNF-α di Limpa diilustrasikan menggunakan Value Path Coefficients dan R2, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.



**Gambar 5:** Model hipotesis hubungan kadar TGF-β Plasma, kadar TGF-β limpa, dan ekspresi TNF-α di Limpa.

### Pembahasan

Mekanisme imun yang kompleks pada malaria melatar belakangi belum ditemukannya vaksin yang bersifat universal dan efektif sampai saat ini. Hal ini disebabkan imunitas spesifik pada malaria bersifat spesifik terhadap spesies, strain/varian dan stadium pada siklus hidup parasit (Perlmann dan Troye-Blomberg, 2002). Respon imun terhadap serangan infeksi terutama dipengaruhi oleh interaksi dari *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) dengan reseptor yang diekspresikan oleh sel host. Banyak penelitian yang mengaitkan *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) dari *Plasmodium falciparum* sebagai PAMP malaria dan sebagai toksin. *glycosylphosphatidylinositol* GPI dapat menginduksi produksi sitokin oleh sel Th-1 atau sel Th-2 yang terlibat dalam patogenesis malaria (Schofield and Grau, 2005).

Sel-sel Th-1 dan Th-2 keduanya mempunyai kontribusi dalam imunitas proteksi terhadap infeksi malaria, namun pada saat yang berbeda dan keseimbangan antara keduanya menentukan manifestasi penyakit. Sel Th-1 bertanggung jawab terhadap kontrol parasitemia pada awal infeksi dan selanjutnya diperlukan Th-2 untuk menuntaskan penghancuran parasit (Wipasa *et al.*, 2002). Hal ini ditunjukkan dengan adanya produksi IFN-γ yang dominan pada awal infeksi akut, kemudian mengalami penurunan seiring dengan penurunan parasitemia dan selanjutnya diganti oleh produksi IL-4 dan IL-10 pada stadium lanjut infeksi (Taylor-Robinson dan Phillips, 1994). Dengan demikian, respon Th1 yang diikuti dengan Th2 penting untuk mengontrol secara efektif perkembangan parasit, namun sebaliknya, aktivasi Th2 pada awal infeksi dapat menyebabkan malaria yang berat dan fatal. Perubahan respon imun dari Th2 menjadi Th1 juga berkaitan dengan perbaikan infeksi *P.falciparum* (Wipasa *et al.*, 2002). Hal ini juga ditunjukkan pada penelitian menggunakan hewan coba yang dilakukan oleh Donovan *et al.* (2007), yang menunjukkan sensitisasi pada mencit BALB/C dengan paparan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* steril dapat merubah respon Th-2 menjadi Th-1 yang dapat menghambat pertumbuhan parasit. Pengenalan antigen oleh sel T dapat menyebabkan sel T berkembang

menjadi T regulatory (T-reg) dalam keberadaan IL-10. Eritrosit terinfeksi berhubungan dengan peningkatan kadar IL-10 di dalam plasma, sehingga dapat menginduksi T-reg. Sel T-reg menekan proliferasi sel TCD4+CD25 yang distimulasi oleh antigen terlarut dan menghambat produksi IL-2 oleh limfosit. Sel T-reg meregulasi respon imun melalui mekanisme yang tergantung kontak sel dengan CTLA4 dan sitokin IL-10 dan TGF- $\beta$ . Oleh karena itu, sel T-reg kemungkinan terlibat dalam supresi respon imun pada malaria (Ndungu *et al.*, 2005).

Dalam penelitian ini setelah di analisis menggunakan SEM pada kelompok 1 dan 2 di dapatkan hasil bahwa infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit dapat meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$  di jaringan limpa, juga menyebabkan penurunan kadar TGF- $\beta$  di plasma dan jaringan limpa.

Sel Th-1 menghasilkan sitokin pro-inflamasi sementara Th-2 berfungsi menghasilkan sitokin anti-inflamasi (Wahyuniati and Maulana, 2015.). Sindrom kompleks dari malaria berhubungan dengan peningkatan kadar sitokin proinflamasi. Malaria parah terjadi terkait dengan kadar TNF- $\alpha$  yang tinggi, peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi lainnya (IFN- $\gamma$  dan IL-1 $\beta$ ), dan penurunan produksi sitokin anti-inflamasi terutama IL-10 dan TGF- $\beta$ . Sitokin yang dihasilkan Th-1 dianggap memegang peran penting untuk pengendalian infeksi *Plasmodium* baik pada fase preeritrositik maupun eritrositik. Namun peningkatan produksi yang berlebih juga berkontribusi pada terjadinya kerusakan organ (Kinra and Dutta, 2013).

Gejala klinis pada malaria merupakan manifestasi dari respon inflamasi oleh sel imun nonspesifik yang di stimulasi oleh rupturnya eritrosit sehingga terjadi ketidakseimbangan antara produksi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi. Pada saat skizon pecah, toksin malaria atau glycosylphosphatidylinositol (GPI) dan pigmen malaria atau hemozoin akan terlepas sehingga merangsang makrofag untuk memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Olivier, 2014).

Pada penelitian ini setelah di analisis SEM pada kelompok 3 dan 4 di dapatkan hasil bahwa ekstrak daun mimba dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  di jaringan limpa juga meningkatkan kadar TGF- $\beta$  di plasma dan jaringan limpa. Hal ini disebabkan karena kemampuan ekstrak daun mimba

mengandung zat aktif yang bersifat antimalaria seperti Azadirachtin, Nimbolide (Agustin, *et al.* 2016).

### Kesimpulan

Perlakuan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  yang tinggi pada limpa dan meningkatkan ekspresi kadar TGF- $\beta$  dalam plasma dan jaringan limpa mencit pada infeksi *Plasmodium berghei*.

Saran perlu di lakukan penelitian dengan menggunakan ekstrak murni daun *Azadirachta indica* dengan konsentrasi berbeda.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Diktis Kemenag Republik Indonesia yang telah memberikan bantuan dana BOPTN 2018. Terima kasih kami ucapkan kepada Heni Endrawati, S.Si dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuannya dalam infeksi mencit dengan *Plasmodium berghei* dan elisa.

### Konflik kepentingan

Tidak ada penulis yang memiliki konflik kepentingan terkait artikel ini

### Daftar Pustaka

- Agustin, *et al.* 2016. *Efektivitas ekstrak daun mimba (Azadirachta indica a. juss) terhadap pertumbuhan koloni alternaria porri penyebab penyakit bercak ungu pada bawang wakegi (Allium x wakegi araki) secara in vitro.* e-J. Agrotekbis 4 (4) : 419-424. ISSN: 2338-3011.
- Calleja-Agius J & Brincat, M.P. 2008. *Recurrent Miscarriages: What is the Role of Cytokines? Gynecological Endocrinology.* 24 (120): 663-668.
- Cui, L. *et al.* 2015. *Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 93, 57-68.
- Donovan, M.J. *et al.* 2007. *Uninfected mosquito bites confer protection against infection with Malaria parasite.* Infection and Immunity. 75(5) : 2523-2530.
- Gimenez, F. *et al.* 2003. *Tumor Necrosis Factor ? In The Pathogenesis of Cerebral Malaria.* Cell.

- Mol. Life Sci. CMLS 60, 1623–1635.
- Irawati, L. 2014. *Hubungan Tumor Necrosis Factor-Alfa (Tnf- $\alpha$ ) dengan Kadar Hemoglobin dan Parasitemia pada Infeksi Malaria Falciparum*. J. Kesehatan. Andalas 3.
- Kemendes RI. 2012. *Buletin Malaria : Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Triwulan I, p 1-17.
- Kinra, P & Dutta, V. 2013. *Serum TNF alpha Levels: A Prognostic Marker for Assessment of Severity of Malaria*. Tropical biomedicine, 30(4), 645–653.
- Muthusamy, A., Achur, R.N, Bhavanandan, V.P., Fouda, G.G., Taylor, D.W. 2004. *Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes Adhere Both in the Intervillous Space and on the Villous Surface of Human Placenta by Binding to the low-sulfated chondroitin sulfate proteoglycan receptor*. Am J Pathol. 164: 2013–2025.
- Veronica, E., Amelia, I., Yunatan, K. A., Chrismayanti, N. K. S. D., & Mahendra, A. N. (2020). *Potensi Kombinasi Ekstrak Daun Kelor (Moringa oliefera) dan Artemisia (Artemisia annua) Sebagai Antimalaria Plasmodium falciparum*. Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada, 12(2), 831-841.
- Ndungu F.M et al., 2005. *Regulation of immune response by Plasmodium-infected red blood cells*. Parasite Immunology, 27:373-384.
- Olivier, M. et al, 2014. *Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response*. Front Immunol.5: 25. doi: [10.3389/fimmu.2014.00025](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00025).
- Perlman P. and Troye-Blomberg M. 2002. *Malaria and the Immune System in Human in Malaria Immunology*, Chem Immunol, Basel, Karger, vol 80 : pp229-242.
- Saito, S et al. 2010. *Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy*. Am J Reprod Immunol; 63;601-610.
- Schofield, L., Grau, G.E. 2005. *Immunological Processes in Malaria Pathogenesis*. Nat. Rev. Immunol. 5, 722–735.
- Silver, KL. et al., 2010. *Dysregulation of Angiopoietins is Associated with Placental Malaria and Low Birth Weight*. PLoS ONE. 5 (3)120-124. Article ID e9481.
- Suguitan AL et al, 2003. *Malaria-Associated Cytokine Changes in the Placenta of Women with Pre-term Deliveries in Yaounde, Cameroon*. Am J Trop Med Hyg;169:2204-9.
- Taylor-Robinson, AW. 2003. *Malaria in Endemic Human Populations Clinical Disease, Immunity, and Protection*. Diakses 30 desember 2011 dari: <http://mirror.internux.co.id/med.sc.edu/www.med.sc.edu:85/parasitology/malaria-atr.htm>.
- Wahyuniati, N., Maulana, R. 2015. *Peran Interleukin-10 pada Infeksi Malaria 9*.
- Wipasa J. et al., 2002. *Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches*. Immunology and Cell biology, 80 : 401-414.
- World Health Organization (WHO). *The Malaria Report* 2018. (Online) <http://www.who.int/malaria/wmr2017/malaria2017>.
- White, N. J. 2004. *Antimalarial drug resistance*. The Journal of clinical investigation, 113(8), 1084-1092.
- Xiao, L et al., 1996. *polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodialmerozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes*. Infect. Immun. 64, 1373–1378 (1996).