

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *PIPER CROCATUM* DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT LIMPA: STUDI PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Lisana Himmatul Ulya¹, Akhmad Ismail², Neni Susilaningsih²

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang : *Piper crocatum* (sirih merah) merupakan tanaman yang dikenal luas di Indonesia dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Kandungan senyawa sirih merah antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tannin. Ekstrak daun sirih merah memiliki efek imunomodulator.

Tujuan : Membuktikan adanya pengaruh pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dosis bertingkat terhadap proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metode : Penelitian eksperimental laboratorik dengan *post test only control group design*. Sampel sebanyak 25 ekor mencit balb/c diadaptasi selama 7 hari. Mencit balb/c dibagi secara *simple random sampling* menjadi 5 kelompok. Kelompok K1 diberi ekstrak *Piper crocatum* peroral 10 mg/mencit/hari, K2 diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal, P1 diberi ekstrak *Piper crocatum* peroral 10 mg/mencit/hari, P2 diberi ekstrak *Piper crocatum* peroral 30 mg/mencit/hari, P3 diberi ekstrak *Piper crocatum* peroral 100 mg/mencit/hari, dan semua kelompok perlakuan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal. Pada hari ke 15 semua mencit terminasi dan dilakukan pemeriksaan proliferasi limfosit metode MTT Assay. Data dideskripsikan dalam bentuk tabel, gambar dan analisa statistik.

Hasil : Rerata proliferasi limfosit limpa tertinggi pada kelompok P3, sedangkan rerata proliferasi limfosit limpa terendah pada kelompok K1. Perbedaan bermakna ($p < 0,005$) didapatkan pada $P1 > K2$, $P2 > K2$, dan $P3 > K2$. Perbedaan tidak bermakna ditemukan pada $K1 - K2$, $P1 - P2$, $P1 - P3$ dan $P2 - P3$.

Simpulan : Pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dosis bertingkat selama 14 hari meningkatkan proliferasi limfosit limpa mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Kata Kunci : *Piper crocatum*, proliferasi limfosit limpa, MTT Assay, *Salmonella typhimurium*

ABSTRACT

THE EFFECT OF PIPER CROCATUM LEAF EXTRACT WITH GRADUAL DOSE ON THE SPLENIC LYMPHOCYTE PROLIFERATION MTT ASSAY METHOD: STUDY IN BALB/C MICE INFECTED WITH SALMONELLA TYPHIMURIUM

Background : *Piper crocatum* (red betel) is a plant widely known in Indonesia and has been used as medicinal plant. Red betel compounds include alkaloids, flavonoids, saponins, triterpenoids, and tannin. The extract of red betel leaf has immunomodulatory effects.

Objective : To prove the effect of leaf extract of *Piper crocatum* with gradual doses on the splenic lymphocyte proliferation of Balb/c mice infected with *Salmonella typhimurium*.

Methods : Experimental laboratory research with post test only control group design. Sample of 25 mice balb/c adapted for 7 days. Sample divided into 5 groups by simple random sampling. K1 group given the extract of *Piper crocatum* orally 10 mg/mouse/day, K2 are infected with *Salmonella typhimurium* intraperitoneally, P1 given extracts of *Piper crocatum* orally 10 mg/mouse/day, P2 given extracts of *Piper crocatum* orally 30 mg/mouse/day, P3 given extracts *Piper crocatum* orally 100 mg/mouse/day, and all treatment groups infected with *Salmonella typhimurium* intraperitoneally. Sampel terminated on 15th day and the splenic lymphocyte proliferation with MTT Assay method examined. Data described in the form of tables, figures and statistical analysis.

Results : The highest average of splenic lymphocyte proliferation is P3 group, while the lowest is K1 group. The significant difference ($p < 0.005$) was found in $P1 > K2$, $P2 > K2$, and $P3 > K2$. The difference of K1-K2, P1-P2, P1-P3 and P2-P3 was found insignificant.

Conclusion : The leaf extract *Piper crocatum* multilevel dose for 14 days increases the splenic lymphocyte proliferation of balb/c mice infected with *Salmonella typhimurium*.

Keywords : *Piper crocatum*, splenic lymphocyte proliferation, MTT assay, *Salmonella typhimurium*

PENDAHULUAN

Tifoid merupakan penyakit infeksi sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella typhi*. Penyakit ini menular melalui makanan atau air yang terkontaminasi. Indonesia merupakan negara endemik tifoid. Prevalensi tifoid klinis nasional berdasarkan Riskesdas tahun 2007 mencapai 1,6%.

Salmonella typhimurium merupakan bakteri intraseluler fakultatif yang menimbulkan manifestasi klinis seperti tifoid pada tikus. Infeksi bakteri intraseluler akan menginduksi respon imun, terutama melalui aktivitas fagositosis. Bakteri intraseluler dapat resisten terhadap degradasi oleh makrofag, sehingga dibutuhkan respon imun adaptif yang diperantarai limfosit T.¹ Antibodi juga berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi *Salmonella*. IgM dan IgA dapat mencegah penetrasi *Salmonella* pada epitel usus.²

Sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman yang dikenal luas di Indonesia. Sirih merah selain dimanfaatkan sebagai tanaman hias, juga dimanfaatkan sebagai tanaman obat, terutama bagian daunnya. Sebagai tanaman obat, sirih merah sering digunakan untuk mengobati diabetes, asam urat, hipertensi, kanker dan peradangan organ tubuh.³

Ekstrak etanol sirih merah diketahui mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, trepenoid dan tanin.⁴ Beberapa penelitian yang telah dilakukan menyebutkan bahwa ekstrak sirih merah memiliki manfaat sebagai imunomodulator.^{5,6}

Tanin dan flavonoid diketahui memiliki efek imunomodulator. Tanin meningkatkan aktivitas limfosit melalui induksi reseptor IL-2R α .⁷ Flavonoid mempengaruhi respon imun dengan meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Ikatan kompleks IL-2 dengan reseptor IL-2R akan mengaktifasi limfosit dan memicu proliferasi limfosit.⁸ Flavonoid juga diketahui dapat mengaktifasi sel NK dan merangsang produksi IFN- γ .⁹

Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan adanya pengaruh pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dosis bertingkat terhadap proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan mengenai efek sirih merah terkait imunomodulator.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* dan menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian. Pemberian perlakuan dan pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Unit Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Terminasi, isolasi dan kultur jaringan, serta pemeriksaan proliferasi limfosit limpa metode MTT Assay dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Secara keseluruhan penelitian ini dilaksanakan dari bulan April sampai dengan Juni 2016.

Sampel yang digunakan yaitu mencit Balb/c yang diperoleh dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Kriteria inklusi yaitu mencit Balb/c jantan, berumur 8-12 minggu, berat badan 20-25 gram dan sehat. Sampel dieksklusi apabila mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif) atau mati selama adaptasi dan perlakuan.

Sampel hanya mengkonsumsi pakan dan minum secara *ad libitum* saat fase adaptasi selama 7 hari. Sampel dibagi menjadi lima kelompok secara acak, terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol 1 (K1) diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari. Kelompok kontrol 2 (K2) diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-10. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-10. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-10. Kelompok perlakuan 3 (P3)

diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 100 mg/mencit/hari selama 14 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-10.

Penelitian ini menggunakan 5 ekor sampel untuk masing-masing kelompok, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan yaitu 25 ekor. Perlakuan terhadap hewan coba diberikan selama 14 hari. Setelah perlakuan selesai, mencit dianesthesia dengan ether kemudian mencit diterminasi dengan dislokasi cervical mencit. Kemudian masing-masing mencit dilakukan isolasi dan kultur limfosit limpa. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan proliferasi limfosit limpa dengan metode MTT Assay.

Data primer yang didapat kemudian dianalisis distribusi datanya dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas datanya dengan *Levene's test*. Data berdistribusi normal dilanjutkan analisisnya dengan uji *One-way ANOVA* untuk menganalisis adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok. Analisis dilanjutkan dengan uji *Post hoc* untuk melihat besarnya perlakuan masing-masing kelompok.

HASIL

Tabel berikut menampilkan proliferasi limfosit limpa metode MTT Assay yang diperoleh dari pembacaan *optical density* (OD) menggunakan *ELISA reader*.

Tabel 1. Hasil analisis deskriptif proliferasi limfosit limpa

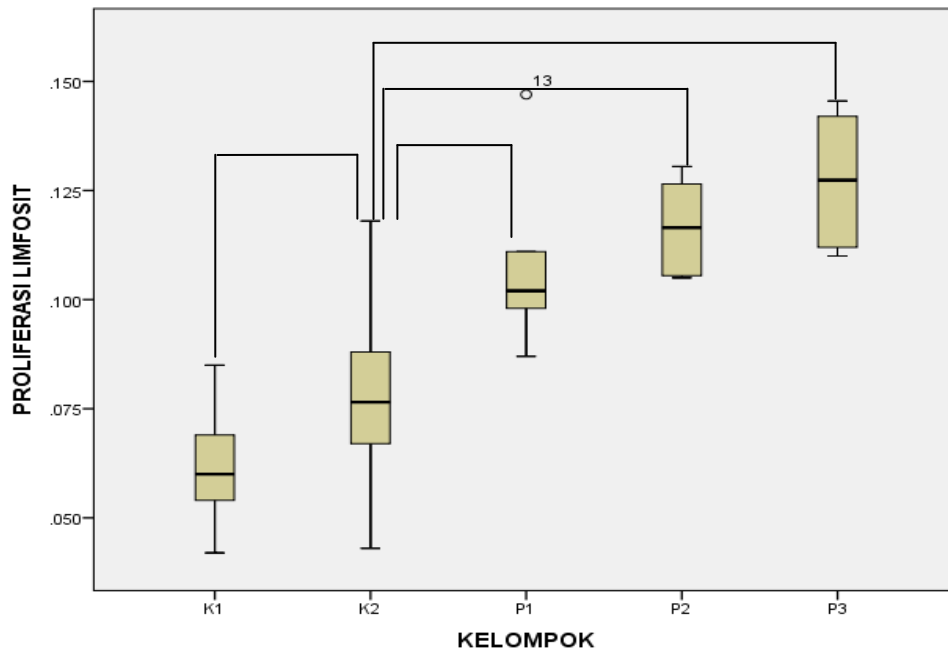
Kelompok	Proliferasi Limfosit Limpa	
	Mean	Standar deviasi
Kontrol 1	0,062	0,016
Kontrol 2	0,078	0,027
Perlakuan 1	0,109	0,022
Perlakuan 2	0,116	0,011
Perlakuan 3	0,127	0,016

Dari tabel tersebut diketahui nilai rerata proliferasi limfosit limpa paling kecil adalah pada kelompok kontrol 1 yaitu $0,062 \pm 0,016$, sedangkan rerata proliferasi limfosit limpa paling besar didapatkan pada kelompok perlakuan 3 yaitu $0,127 \pm 0,016$.

Hasil rerata proliferasi limfosit limpa metode MTT Assay dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro-wilk*. Pada kelompok kontrol 1, kontrol 2, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 didapatkan nilai $p \geq 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

Data diuji variansinya dengan *Levene Test* dan didapatkan $p=0,673$ sehingga varian data homogen. Data kemudian diuji dengan *One-way anova*. Hasil uji *One-way anova* didapatkan $p=0,00$ yang menunjukkan adanya perbedaan proliferasi limfosit limpa bermakna antar kelompok.

Analisis dilanjutkan dengan uji *Post-hoc* untuk mengetahui kelompok yang memiliki hasil perbedaan proliferasi limfosit limpa yang bermakna.



Gambar 1. Grafik rerata proliferasi limfosit limpa metode MTT Assay

Gambar 1 menunjukkan adanya perbedaan proliferasi limfosit limpa yang bermakna antara kelompok kontrol 2 dengan kelompok perlakuan 1 ($p=0,024$), kelompok perlakuan 2 ($p=0,006$) dan kelompok perlakuan 3 ($p=0,001$). Perbedaan antara kelompok kontrol 1 dengan kelompok kontrol 2 tidak bermakna ($p=0,202$).

Perbedaan tidak bermakna juga ditemukan antara kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2 ($p=0,540$) dan antara kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 3 ($p=0,157$). Perbedaan antara kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3 juga tidak bermakna ($p=0,480$).

PEMBAHASAN

Proliferasi limfosit limpa pada kelompok yang diberi ekstrak *Piper crocatum* saja (kelompok K1) lebih rendah dibanding proliferasi limfosit pada kelompok yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* saja (kelompok K2), namun perbedaan ini tidak bermakna. Hal ini menunjukkan pemberian ekstrak *Piper crocatum* maupun infeksi *Salmonella* memicu respon imun tubuh.

Hasil penelitian ini menyebutkan bahwa pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* selama 14 hari pada mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan dosis 10 mg/mencit/hari sebagai kelompok perlakuan 1, dosis 30 mg/mencit/hari sebagai kelompok perlakuan 2 dan dosis 100 mg/mencit/hari sebagai kelompok perlakuan 3 memberikan peningkatan proliferasi limfosit limpa yang bermakna dibanding kelompok kontrol 2, yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* saja. Hal ini berarti pemberian ekstrak *Piper crocatum* meningkatkan proliferasi limfosit limpa. Hasil ini sejalan dengan hipotesis peneliti.

Proliferasi limfosit limpa meningkat pada kelompok perlakuan 3 dibanding kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 1, namun peningkatan ini tidak bermakna. Proliferasi limfosit limpa pada kelompok perlakuan 2 meningkat dibanding kelompok perlakuan 1, namun peningkatan ini juga tidak bermakna. Hal ini berarti penambahan dosis ekstrak daun *Piper crocatum* tidak meningkatkan proliferasi limfosit limpa secara signifikan.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya oleh Yustina Sri Hartini, dkk pada tahun 2014. Penelitian sebelumnya menggunakan ekstrak metanol yang diperoleh dengan metode VLC (*vacuum liquid chromatography*). Induksi respon imun dengan menginjeksikan bakteri *Listeria monocytogenes* pada hari ke-15 dan 25 secara intraperitoneal. Terminasi dilakukan pada hari ke 37. Hasil penelitian sebelumnya tidak didapatkan perbedaan proliferasi limfosit yang bermakna pada kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan ekstrak ethanol sirih merah yang diperoleh dengan metode maserasi. Induksi respon imun dilakukan dengan menginjeksikan bakteri *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke 10. Terminasi dilakukan pada hari ke 15.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* per oral dengan dosis 10, 30 dan 100 mg/mencit/hari selama 14 hari meningkatkan proliferasi limfosit limpa mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibanding dengan kelompok kontrol. Penambahan dosis *Piper crocatum* tidak memberikan peningkatan proliferasi limfosit limpa yang signifikan.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis yang lebih bervariasi, rentang waktu pemberian ekstrak dan infeksi bakteri yang berbeda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Jurnal Karya Tulis Ilmiah ini. Penulis juga berterima kasih kepada dr. Ratna Damma Purnawati, M.Kes selaku ketua penguji dan dr. Agung Aji Prasetyo, Sp.BA, M.Si. Med. selaku penguji, serta keluarga dan teman-teman yang senantiasa memberikan doa dan dukungan sehingga penulisan hasil karya tulis ilmiah ini dapat terselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Munasir Z. Respons Imun Terhadap Infeksi Bakteri. *Sari PEDIATR*. 2001;2(4):193-197.
2. Mittru H, Kaufmann SHE. Immune Response to Infection with *Salmonella typhimurium* in Mice. *J Leukoc Biol*. 2000;67:457-463.
3. Agromedia R. *Buku Pintar Tanaman Obat: 431 Jenis Tanaman Penggempur Penyakit*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka. 2008.
4. Lister INE, Viany RD, Nasution AN, Zein R. Antimicrobial Activities of Methanol Extract of Sirih Merah (*Piper crocatum* L.) leaf. 2014;6(12):650-654.
5. Hartini YS, Wahyuono S, Widayarni S. Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara In Vitro. 2013;11(2):108-115.

6. Hartini YS, Wahyuono S, Widyarini S. In vivo Immunomodulatory Effect and Histopathological Features of Mouse Liver and Kidney Treated with Neolignans Isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Leaf. 2014;13(October):1609-1614.
7. Holderness J, Jackiw L, Kimmel E, et al. Select Plant Tannins Induce IL-2R Up-Regulation and Augment Cell Division in T Cells. *J Immunol.* 2007;179:6468-6478.
8. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Medical Immunology*. 10th ed. Singapore: Mc Graw Hill; 2003.
9. Sulistini RP. *Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (Colocasia Esculenta L Schoot) Terhadap Aktivitas Fagositosis Dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb / C Sebelum Dan Sesudah Terinfeksi Listeria Monocytogenes*. Skripsi. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. 2015.