

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (*PIPER CROCATUM*) DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PRODUKSI NITRIT OKSIDA (NO) MAKROFAG: STUDI PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Fariz Rifqi¹, 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: Sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman obat yang multi khasiat. Daun *Piper crocatum* memiliki kandungan diantaranya tanin, saponin, alkaloid dan flavonoid. Senyawa flavonoid meningkatkan imunitas yang dapat mengaktifkan makrofag untuk memproduksi nitrit oksida. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak sirih merah terhadap daya tahan mencit yang terinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan menilai kemampuan produksi nitrit oksida.

Tujuan: Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih merah dosis 10, 30, 100 mg/hari/mencit terhadap produksi makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang terdiri dari K1 yang hanya diberikan ekstrak daun *Piper crocatum* 10 mg/hari/mencit dan K2 yang hanya diberikan injeksi intraperitoneal *Salmonella typhimurium* serta kelompok perlakuan (P1,P2,P3) yang diberikan injeksi intraperitoneal *Salmonella typhimurium* dan ekstrak daun *Piper crocatum* dosis berturut-turut 10,30,100 mg/hari/mencit.

Hasil: Rerata produksi nitrit oksida makrofag masing-masing kelompok: K1 = 18,21; K2 = 21,53; P1 = 14,47; P2 = 31,69; P3 = 3,06. Produksi nitrit oksida makrofag antara kelompok kontrol dengan perlakuan dan antar kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang signifikan, yaitu antara K1-K2, K2-P1, K2-P2, K2-P3, P1-P2, P1-P3, dan P2-P3.

Simpulan: Pemberian ekstrak daun sirih merah dosis 30 mg/hari/mencit meningkatkan produksi nitrit oksida makrofag sedangkan dosis 10 dan 100 mg/hari/mencit menurunkan produksi nitrit oksida makrofag dibandingkan dengan kelompok kontrol 2 (K2).

Kata kunci: *Piper crocatum*, nitrit oksida, *Salmonella typhimurium*.

ABSTRACT

THE EFFECT OF RED BETLE LEAVE (*PIPER CROCATUM*) ON THE MACROPHAGE NITRIC OXIDE PRODUCTION IN BALB/C MICE INFECTED BY *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Background: *Piper crocatum* is a multi efficacy herbal medicine. Its leave consists of tannins, saponins, alkaloids and flavonoids. Flavonoids improve immunity to activate macrophages nitric oxide production. This research purpose is to evaluate the effect of *piper crocatum* extract into the immune system of *Salmonella Thyphimurium* infected mice by considering the ability of macrophage nitric oxide production.

Aim: To understand the effect of Piper crocatum leave extract doses 10, 30, 100 mg/day/mice onto macrophage nitric oxide production of Salmonella typhimurium infected BALB/C mice.

Methods: This study was an experimental laboratory design of Post Test Only Control Group Design. The research utilized 5 groups, control group consists of C1 that only given the extract of Piper crocatum leave of 10 mg/day/mouse and C2 only given intraperitoneal of Salmonella typhimurium injection while other group (P1,P2,P3) given the intraperitoneal of Salmonella typhimurium injection as well as the extract of Piper Crocatum leaf with dose of 10, 30, 100 mg/day/mouse.

Result: Average Indexes of nitric oxide production on each group are: C1 = 18,21; C2 = 21,53; P1 = 14,47; P2 = 31,69; P3 = 3,06. There were significant differences among C groups and P groups. Those are C1-C2, C2-P1, C2-P2, C2-P3, P1-P2, P1-P3, and P2-P3.

Conclusion: Piper crocatum leave extract dose of 30 mg/day/mice increase macrophage nitric oxide production, while a dose of 10 and 100 mg/day /mouse lowering macrophage nitric oxide production compared with control group II (C2)

Keywords: Piper crocatum, nitric oxide, Salmonella typhimurium

PENDAHULUAN

Sirih merah merupakan salah satu tanaman yang sudah dikenal luas di Indonesia yang berasal dari Peru, Amerika Selatan.¹ Sirih merah selain dimanfaatkan sebagai tanaman hias, juga dimanfaatkan sebagai tanaman obat terutama bagian daunnya. Sebagai tanaman obat, sirih merah dimanfaatkan untuk mengobati penyakit infeksi seperti radang pada gigi, sariawan, radang pada mata, radang prostat. Khasiat sirih merah juga untuk beberapa penyakit antara lain diabetes, asam urat, hipertensi, kanker dan peradangan organ tubuh.^{1,2}

Kandungan kimia yang terdapat pada tanaman sirih merah diketahui mengandung senyawa berupa flavonoid, alkaloid, saponin, triterpenoid, serta tannin.³ Senyawa flavonoid dari sirih merah diketahui bersifat antiseptik, antidiabetes, antikanker, anti-inflamasi, dan antioksidan.² Dalam hal ini ekstrak sirih merah merupakan salah satu imunomodulator yang telah teruji dalam meningkatkan imunitas.^{4,5}

Salmonella typhimurium merupakan mikroorganisme fakultatif intraseluler yang dapat hidup serta berkembangbiak dalam makrofag serta menyebabkan terjadinya demam tifoid.^{6,7} Demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhimurium* merupakan penyakit infeksi serius yang menjadi masalah kesehatan global termasuk Indonesia dan Negara-negara Asia Tenggara seperti Malaysia dan Thailand. Angka kejadian akibat penyakit ini mencapai 358-810 per 100.000 penduduk setiap tahun.⁶

Respon imun tubuh pada infeksi bakteri intraseluler terutama melalui aktivitas fagositosis.⁷ *Salmonella typhimurium* tahan terhadap enzim-enzim lisosom, serta mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menghambat fusi *phagosome-lysosome* sehingga sulit

dibunuh,^{8,9} sehingga untuk membunuh kuman ini adalah dengan memacu fungsi makrofag untuk *killing* melalui *respiratory burst*, baik dengan proses oksidatif maupun non-oksidatif sehingga diproduksi radikal bebas dan Nitrit Oksida (NO).

Perlawanan sistem imun terhadap bakteri intraseluler berupa reaksi pembunuhan bakteri intraseluler atau reaksi lisis sel yang terinfeksi bakteri intrasel. Reaksi pembunuhan bakteri intraseluler diperankan oleh makrofag dengan cara memproduksi molekul mikrobisidal intraseluler *reactive oxygen*, NO, *lysosomal reactive oxygen species* (ROS) dan NO dipengaruhi oleh *Interferon-gamma* (IFN- γ) yaitu melalui aktifasi transkripsi gen-gen yang mengkode enzim *phagocyte oxidase* yaitu enzim penghasil ROI dan enzim iNOS.^{10,11,12}

Meningkatnya kadar NO dimulai dari respon imun natural dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti oleh pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi inang terhadap infeksi, peran ini salah satunya dilakukan oleh makrofag dengan cara memproduksi NO.¹²

Berdasarkan latar belakang tersebut, kami ingin meneliti mengenai pengaruh pemberian daun sirih merah (*Piper crocatum*) dosis bertingkat terhadap produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini adalah eksperimental dengan desain *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang terdiri dari Kontrol 1 (K1) dan Kontrol 2 (K2) serta kelompok perlakuan yang terdiri dari Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) dan Perlakuan 3 (P3) masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit Balb/c. Penelitian ini dilaksanakan Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada bulan April sampai dengan Juni 2016.

Sampel penelitian adalah mencit Balb/c jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel penelitian berjumlah 25 mencit. Kriteria inklusi penelitian ini adalah mencit jantan Balb/c, umur 6-8 minggu, berat badan 20 – 25 gram, sehat, tidak ada kecacatan anatomis, tidak sakit selama adaptasi. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah selama diinfeksi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif), mati selama adaptasi dan perlakuan.

Mencit Bal/c sebanyak 25 ekor diadaptasikan selama 7 hari, hari berikutnya mencit dibagi secara randomisasi menjadi 5 kelompok yaitu dua kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol 1 atau K1 (hanya diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 10mg/hari/mencit selama

14 hari), kelompok kontrol 2 atau K2 (hanya diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10) dan tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan 1 atau P1 (diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 10mg/hari/mencit selama 14 hari dan diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10), kelompok perlakuan 2 atau P2 (diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 30mg/hari/mencit selama 14 hari dan diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10), dan kelompok perlakuan 3 atau P3 (diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 100mg/hari/mencit selama 14 hari dan diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10). Setelah perlakuan selesai, mencit dianestesia dengan ether selanjutnya mencit diterminasi dengan dislokasi cervical mencit. Kemudian masing-masing mencit dilakukan isolasi makrofag dari rongga peritoneumnya dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan produksi NO (Nitrit Oksida) makrofag dengan metode Griess

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian yang telah dilakukan yaitu mengenai pengaruh pemberian ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) dosis bertingkat terhadap produksi nitrit oksida makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Penelitian menggunakan 25 sampel mencit Balb/c usia 8 minggu, sehat dengan berat 20 - 25 gram yang dibagi 5 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

Mencit Balb/c diterminasi dengan cara dislokasi cervical mencit dan cairan peritoneum tiap sampel mencit diambil dengan isolasi makrofag dari rongga peritoneumnya melalui metode Ding, selanjutnya dilakukan pemeriksaan jumlah NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag peritoneum yang diukur dengan Metode Griess dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer konvensional pada panjang gelombang 545 nm.

Analisis Deskriptif

Dengan mengamati preparat penelitian, lalu dilakukan analisis deskriptif maka didapatkan data sebagai berikut

Tabel 1. Data deskriptif Pengukuran Nitrit Oksida

Kelompok	Mean	Standar Deviasi
K1	18,21	2,75
K2	21,53	2,87
P1	14,47	3,13
P2	31,69	7,20
P3	3,06	0,57

Ket : K1: Kelompok Kontrol 1

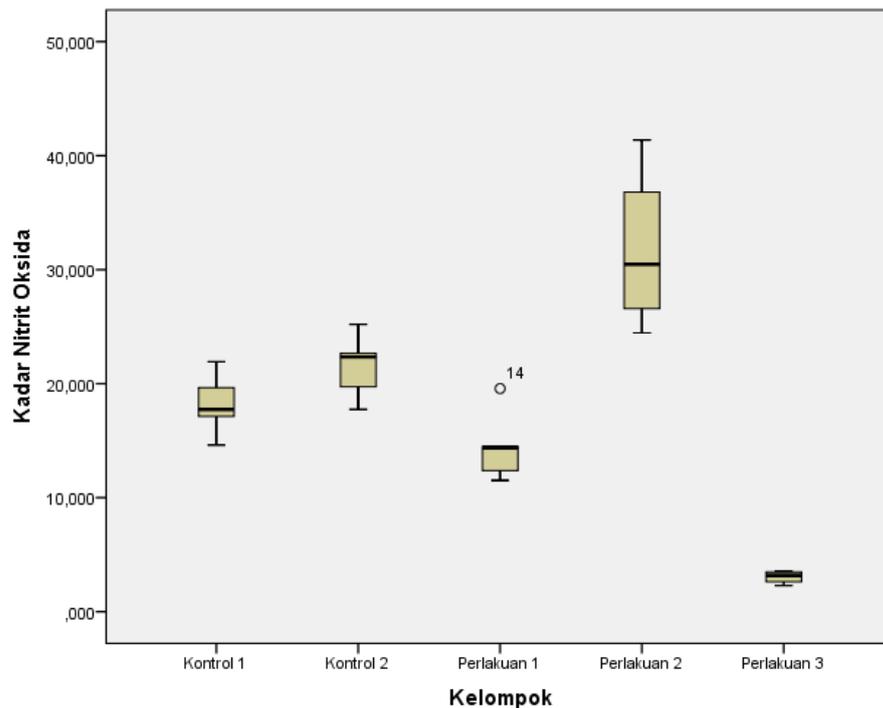
K2: Kelompok Kontrol 2

P1: Kelompok Perlakuan 1

P2: Kelompok Perlakuan 2

P3: Kelompok Perlakuan 3

Berdasarkan tabel 1 di atas menunjukkan hasil rerata produksi nitrit oksida makrofag tertinggi pada kelompok kontrol yaitu kelompok K2 dengan nilai mean 21,53 sedangkan nilai mean produksi nitrit oksida makrofag kelompok K1 adalah 18,21. Jumlah produksi nitrit oksida makrofag tertinggi pada kelompok perlakuan yaitu P2 dengan nilai mean 31,69 sedangkan produksi nitrit oksida terendah pada kelompok perlakuan P3 dengan nilai mean 3,06.

**Gambar Box Plot** Produksi Nitrit Oksida

Hasil Uji Beda

Rerata produksi nitrit oksida makrofag dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan didapatkan distribusi normal karena nilai $p > 0,05$ sehingga dilanjutkan uji varians *Test homogeneity of variance*. Hasil uji *Test homogeneity of variance* didapatkan $p=0,087$ yang menunjukkan varians data adalah sama. Karena varians data sama, maka uji *One Way Anova* adalah valid. Pada uji *One Way Anova*, didapatkan nilai $p=0,00$. Hal ini secara mutlak menunjukkan bahwa terdapat perbedaan produksi nitrit oksida makrofag yang bermakna ($p<0,05$). Uji statistik kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok. Perbedaan signifikan apabila didapatkan nilai $p<0,05$.

Tabel 2. Nilai p pada uji Post-hoc data produksi nitrit oksida makrofag

Kelompok	Kontrol II	Perlakuan I	Perlakuan II	Perlakuan III
Kontrol I	0,646	0,538	0,000*	0,000*
Kontrol II	-	0,058	0,007*	0,000*
Perlakuan I		-	0,000*	0,002*
Perlakuan II			-	0,000*

Keterangan : * Signifikan $p < 0,05$

Produksi nitrit oksida makrofag antara kelompok kontrol I dan kontrol II tidak ada perbedaan yang bermakna dengan nilai $p=0,646$. Perbedaan yang tidak bermakna juga ditemukan antara kelompok kontrol I dengan kelompok perlakuan I ($p=0,0538$), tetapi ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol I dengan kelompok perlakuan II ($p=0,000$) dan perlakuan III ($p=0,000$).

Uji Post Hoc produksi nitrit oksida makrofag antara kelompok kontrol II dengan P1 didapatkan hasil yang tidak signifikan nilai $p=0,058$, namun antara kelompok kontrol II dengan masing-masing kelompok perlakuan P2,P3 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p<0,05$, sedangkan antara masing kelompok perlakuan juga terdapat perbedaan yang signifikan.

Pembahasan

Perlawanan sistem imun terhadap bakteri intraseluler berupa reaksi pembunuhan bakteri intraseluler atau reaksi lisis sel yang terinfeksi bakteri intrasel. Reaksi pembunuhan bakteri intraseluler diperankan oleh makrofag dengan cara memproduksi molekul mikrobisidal intraleluler *reactive oxygen*, NO, *lysosomal reactive oxygen species* (ROS) dan

NO dipengaruhi oleh *Interferon-gamma* (IFN- γ) yaitu melalui aktivasi transkripsi gen-gen yang mengkode enzim *phagocyte oxidase* yaitu enzim penghasil ROI dan enzim iNOS.^{10,11,12}

Meningkatnya kadar NO dimulai dari respon imun natural dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti oleh pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi inang terhadap infeksi, peran ini salah satunya dilakukan oleh makrofag dengan cara memproduksi NO.¹²

Infeksi *Salmonella typhimurium* ini mengaktifkan sistem imun seluler. Limfosit T dan makrofag saling bekerja sama untuk membunuh salmonella. Makrofag akan memfagosit bakteri dan limfosit berdiferensiasi menjadi CD4 dan CD8. Sel CD4 berdiferensiasi menjadi Th1 yang kemudian menghasilkan sitokin IFN- γ dan TNF- α serta memacu sel NK. Sel CD8 pun menghasilkan sitokin IFN- γ . Sitokin tersebut akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan senyawa salah satunya nitrit oksida yang berguna membunuh bakteri.¹¹

Kadar NO makrofag K1 dibandingkan dengan K2 tidak ada perbedaan yang signifikan. Kadar NO makrofag kelompok perlakuan P2 (dosis ekstrak 30 mg) lebih tinggi daripada kelompok P1 (dosis ekstrak 10 mg) dan kelompok P3 (dosis ekstrak 100 mg). Kelompok P1 kadar NO makrofag lebih rendah dibandingkan dengan kelompok P2 tetapi masih lebih tinggi dari kelompok P3. Pemberian ekstrak daun sirih merah pada kelompok P3 yang terlalu tinggi menyebabkan terjadinya stress oksidatif.

Dosis yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif sehingga mengakibatkan kehilangan aktivitas biologi dari endotel dapat menurunkan kadar nitrit oksida dan mengakibatkan peningkatan ekspresi faktor protrombotik, adhesi molekuler proinflamasi, sitokin dan factor-faktor kemotaktik. Sitokin dapat menurunkan bioaktivitas dari nitrit oksida, meningkatkan produksi ROS. ROS menurunkan aktifitas nitrit oksida secara langsung melalui sel endotel dan secara tidak langsung melalui *inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)* atau *Guanylyl Cyclase*.^{13,14}

Berdasarkan tabel 1. Data deskriptif Pengukuran Nitrit Oksida bahwa produksi NO makrofag kelompok P1 dan P2 mengalami penurunan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol K1 dan K2, tetapi pada kelompok P3 mengalami peningkatan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol K1 dan K2, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih merah dengan dosis 30 mg/hari/oral dapat meningkatkan produksi NO makrofag secara bermakna pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian ekstrak daun sirih merah secara per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 hari meningkatkan produksi nitrit oksida makrofag mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibanding dengan kelompok kontrol. Pemberian ekstrak daun sirih merah secara per oral dengan dosis 10 dan 100 mg/mencit/hari selama 14 hari menurunkan produksi nitrit oksida makrofag mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibanding dengan kelompok kontrol.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis yang lebih bervariasi, rentang waktu pemberian ekstrak dan infeksi bakteri yang berbeda. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan. Perlu dilakukan uji toksisitas dosis ekstrak daun sirih merah, serta perlu dilakukan uji klinis untuk lebih mengetahui efek imunomodulator. Membaca preparat sebanyak mungkin agar dapat mewakili jumlah produksi nitrit oksida makrofag sehingga meminimalkan kesalahan dalam menginterpretasikan data.

DAFTAR PUSTAKA

1. Astuti IP, Munawaroh E. Karakteristik Morfologi Daun Sirih Merah: *Piper crocatum* Riutz & Pav dan *Piper porphyrophyllum* N.E.Br. Koleksi Kebun Raya Bogor. *Berk Penel Hayati Ed Khusus*. 2011;7A:83-85.
2. Agromedia R. *Buku Pintar Tanaman Obat: 431 Jenis Tanaman Penggempur Penyakit*. Jakarta: PT Agromedia Pusstaka; 2008.
3. Lister INE, Viany RD, Nasution AN, Zein R. Antimicrobial activities of methanol extract of Sirih Merah (*Piper crocatum* L.) lleaf. 2014;6(12):650-654.
4. Hartini YS, Wahyuono S, Widyarini S. Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara In Vitro (Phagocytic Macrophage Activity of Fractions from Methanolic Leaf Extract of Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) In. 2013;11(2):108-115.
5. 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.

6. Gasem MH. *Typhoid fever, clinical and epidemiological studies in Indonesia*. Thesis Nijmegen University, Netherlands. Semarang Indonesia Diponegoro University Press, 2001
7. Kresno SB. *Immunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi Keempat. Jakarta, Balai Penerbit FK.UI, 2001 ; 1-131
8. Agromedia R. *Buku Pintar Tanaman Obat: 431 Jenis Tanaman Penggempur Penyakit*. Jakarta: PT Agromedia Pusstaka; 2008
9. Sudewo, B. *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*. PT. AgroMedia Pustaka, Jakarta. 2005.
10. Murwani H, Pengaruh pemberian teh rosella terhadap fungsi makrofag mencit Balb/C, Tesis. Semarang: Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro. 2010
11. Pantas FM. Pengaruh Pemberian Seduhan The Hitam (*Camellia sinesis*) Dosis Bertingkat terhadap Aktivitas Fagosit Makrofag Mencit Balb/C yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Tesis Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro, Semarang. 2009.
12. Suharni. Pengaruh Jus Lidah Buaya (*Aloe vera*) terhadap Kemampuan Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitrit Oxide pada mencit BALB/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Tesis Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro, Semarang. 2003.
13. Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai S, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S, and Channon KM. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res* 97: 864–871, 2005.
14. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, and Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10: 1115–1126, 2008.