

## **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PRODUKSI PEROKSIDA MAKROFAG: STUDI PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM**

Nesha Tabita Rachel Br. Tarigan<sup>1</sup>, Ratna Damma Purnawati<sup>2</sup>, Neni Susilaningsih<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Staf Pengajar Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

### **ABSTRAK**

**Latar Belakang:** Salah satu tanaman obat yang banyak digunakan dan terdapat di Indonesia adalah sirih merah. Sirih merah mengandung zat aktif seperti flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid dalam sirih merah dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (Specific Makrofag Activating Factor) yang dapat mengaktifkan makrofag.

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

**Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *Post Test Only Control Group Design*. Sampel berjumlah 25 ekor mencit Balb/c jantan dan dibagi secara random menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang terdiri dari K1 yang hanya diberikan ekstrak daun sirih merah 10 mg/hari/mencit selama 14 hari dan K2 yang hanya diberikan injeksi intraperitoneal *Salmonella* typhimurium pada hari ke 10 serta kelompok perlakuan (P1,P2,P3) yang diberikan injeksi intraperitoneal *Salmonella* Typhimurium pada hari ke 10 dan ekstrak daun sirih merah dosis berturut-turut 10,30,100 mg/hari/mencit selama 14 hari.

**Hasil:** Median kadar peroksida makrofag masing-masing kelompok : K1 = 0,001; K2 = 0,000; P2 = 0,007; P3 = 0,0015. Kelompok P1 memiliki rerata 0,002. Kelompok P2 memiliki perbedaan bermakna dan terdapat peningkatan tidak signifikan pada kelompok P1 dan P3.

**Simpulan:** Pemberian ekstrak daun sirih merah dosis bertingkat berpengaruh terhadap peningkatan kadar peroksida makrofag. Dosis optimum daun sirih merah untuk meningkatkan kadar peroksida makrofag adalah dosis 30mg/hari/mencit.

**Kata kunci:** sirih merah, kadar peroksida makrofag, *Salmonella* Typhimurium.

### **ABSTRACT**

#### **THE EFFECT OF EXTRACT RED BETEL LEAF GRADUAL DOSE ONTO PRODUCTION OF MACROPHAGES PEROXIDE: STUDY ON BALB/C MICE INFECTED BY *SALMONELLA* TYPHIMURIUM**

**Background:** One of the medicinal plants that is widely used in Indonesia is red betel. Red betel contains active substances such as flavonoid and alkaloid. Flavonoid compounds in red betel has already been reported to stimulate the activity of IL-2 and proliferation of lymphocytes. Lymphocyte proliferation will affect CD4+ cells, then activates Th1 cells. Activated Th1 cells will affect SMAF (Specific Macrophage Activating Factor)that can activate macrophages.

**Aim:** To determine the effect of red betel leaf extract doses 10, 30, 100 mg/day/mice onto production of macrophages peroxide Balb/c mice infected by Salmonella Typhimurium.

**Methods:** This study was a laboratory experimental with Post Test Only Control Group Design. The samples were 25 male Balb/C mice, randomly divided into 5 groups: control group consists of K1 that only given the extract of red bettel leaf 10 mg/day/mice for 14 days and K2 that only given intraperitoneal injection of Salmonella Typhimurium on day 10. Treatment group (P1, P2, P3) were given intraperitonel injection of Salmonella Typhimurium on day 10 and extract of red betel leaf doses 10, 30, 100 mg/day/mice for 14 days.

**Result:** Median of macrophages peroxide level on each group are : K1 = 0.001; K2 = 0,000; P2 = 0.007; P3 = 0.0015. Mean of P1 group is 0.002. P2 group has a significant difference and there is not significantly increased in group P1 and P3.

**Conclusion:** The extract of red betel leaf graded doses affect the increased level of macrophages peroxide. The extract of red betel leaf dose 30 mg/day/mice is the optimum dose for increasing level of macrophages peroxide.

**Keywords:** red betel, macrophages peroxide level, Salmonella Typhimurium.

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang banyak dialami oleh masyarakat Indonesia. Salah satu penyakit yang sering dialami adalah diare. Penyakit diare merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia karena morbiditas dan mortalitasnya yang tinggi. Survei morbiditas yang dilakukan oleh Subdit Diare, Departemen Kesehatan dari tahun 2000 s/d 2010 terlihat kecenderungan insidens naik. Pada tahun 2000 IR penyakit Diare 301/ 1000 penduduk, tahun 2003 naik menjadi 374 /1000 penduduk, tahun 2006 naik menjadi 423 /1000 penduduk dan tahun 2010 menjadi 411/1000 penduduk. Diare merupakan penyebab kematian ke 3 penyakit menyular setelah TB dan Pneumonia.<sup>1</sup>

Diare dapat disebabkan oleh berbagai macam hal, salah satunya infeksi bakteri. Salmonella Typhimurium merupakan salah satu patogen yang dapat menyebabkan diare. Hal ini memerlukan penanganan karena diare oleh Salmonella Typhimurium dapat menjadi berat sehingga terjadi gangguan elektrolit dan dehidrasi.<sup>2</sup>

Pengobatan tradisional di Indonesia telah berkembang sejak dahulu dan digunakan secara turun temurun. Obat tradisional digunakan untuk memelihara kesehatan, mencegah penyakit, mengobati penyakit maupun memulihkan kesehatan.<sup>3</sup> Salah satu tanaman yang banyak digunakan dan terdapat di Indonesia adalah sirih merah (*Piper crocatum*). Bagian sirih merah yang sering digunakan adalah daunnya. Sirih merah sering dipakai di masyarakat untuk penyakit diabetes.hipertensi, kanker payudara, peradangan, hepatitis, asam urat, maag, luka dan lain-lain.<sup>4</sup>

Studi secara *in vitro* membuktikan bahwa sirih merah memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara, antioksidan, dan sebagai anti kanker terhadap sel HeLa.<sup>5</sup> Fraksi hasil kromatografi cair vakum dari ekstrak methanol daun sirih merah juga menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis makrofag.<sup>6</sup>

Senyawa flavonoid dalam sirih merah dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (Specific Makrofag Activating Factor) yang dapat mengaktifkan makrofag.<sup>7,8</sup>

Makrofag merupakan salah satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik dalam fagositosis maupun perannya sebagai antigen presenting cell (APC). Makrofag sebagai sel fagosit memiliki 2 mekanisme dalam membunuh, yaitu proses oksidatif dan proses non oksidatif. Proses oksidatif terjadi karena penggunaan oksigen yang meningkat akan diubah menjadi reactive oxygen intermediates (ROIs), yang terdiri dari hidrogen peroksida, anion superoksida dan hidroksil radikal.<sup>9,10</sup>

Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan hidrogen peroksida sehingga penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak daun sirih merah terhadap produksi peroksida makrofag.

## **METODE**

Ruang lingkup keilmuan pada penelitian ini adalah Ilmu Histologi, Mikrobiologi dan Farmakologi. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama 2 bulan.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *post test only control group design* yang menggunakan mencit sebagai obyek penelitian. Populasi terjangkau penelitian adalah mencit jantan strain Balb/c dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya. Sampel penelitian ini berjumlah 25 ekor mencit yang diperoleh dari kriteria inklusi mencit jantan Balb/c, berat badan 20-25 gram, usia 8-12 minggu, sehat dan tidak terdapat kelainan anatom serta kriteria eksklusinya adalah mencit tampak sakit dan mati selama adaptasi.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah, sedangkan variabel terikatnya adalah kadar peroksida makrofag. Alat yang digunakan adalah kandang mencit, sonde, spuit untuk injeksi Salmonella Typhimurium, alat untuk membuat ekstrak sirih

merah, alat untuk mengisolasi makrofag mencit, dan spektrofotometer. Bahan yang digunakan meliputi mencit jantan strain Balb/c, ekstrak daun sirih merah, alkohol 70%, ether, bahan untuk mengisolasi makrofag mencit, bahan untuk memeriksa produksi peroksida makrofag peritoneum, kit peroksida, bakteri Salmonella Typhimurium, makanan dan minuman mencit standar.

Dua puluh lima ekor mencit strain Balb/c diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama 1 minggu secara ad libitum. Satu minggu setelah adaptasi mencit dibagi secara random menjadi lima kelompok dan diberi perlakuan sebagai berikut:

K1: mencit hanya diberi ekstrak daun sirih merah 10 mg/mencit per oral dengan cara disonde selama 14 hari.

K2: mencit hanya diinfeksi dengan Salmonella Typhimurium intraperitoneal sebanyak 105 CFU pada hari ke-10.

P1: mencit diberi ekstrak daun sirih merah 10 mg/mencit peroral dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan Salmonella Typhimurium sebanyak 105 CFU intraperitoneal.

P2: mencit diberi ekstrak daun sirih merah 30 mg/mencit peroral dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan Salmonella Typhimurium sebanyak 105 CFU intraperitoneal.

P3: mencit diberi ekstrak daun sirih merah 100 mg/mencit peroral dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan Salmonella Typhimurium sebanyak 105 CFU intraperitoneal.

Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum ad libitum. Setelah perlakuan selesai, mencit dianestesi dengan ether selanjutnya mencit diterminasi dengan cara dislokasi cervicalnya, kemudian diambil cairan peritoneumnya. Selanjutnya cairan dikultur dan diperiksa produksi peroksidanya. Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan dilakukan uji normalitas Saphiro-Wilk. Data yang memiliki distribusi normal dan varians sama dilanjutkan dengan uji beda hipotesis One Way Anova, jika  $P < 0.05$  dilanjutkan dengan uji Post Hoc. Bila distribusi data tidak normal, atau varian data tidak sama maka data di transformasi. Jika setelah di transformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji non

parametrik Kruskal-Wallis, jika didapat  $P < 0.05$  dilanjutkan dengan menggunakan uji Mann Whitney.

## HASIL

### Karakteristik Subjek Penelitian

Pembacaan kadar peroksida makrofag mencit menggunakan alat spektrofotometer. Data yang diperoleh dari pembacaan adalah data numerik. Data diuji normalitasnya. Data yang normal dideskripsikan dengan rerata dan simpangan baku sedangkan data yang tidak normal dideskripsikan dengan median dan minimum-maksimum. Kelompok K1, K2, P2, dan P3 memiliki distribusi data tidak normal dengan nilai Saphiro-Wilk  $p < 0,05$  sedangkan P1 memiliki distribusi normal dengan  $p > 0,05$ .

**Tabel 1.** Data deskriptif pengamatan kadar peroksida makrofag

Kelompok	N	Median (min-maks)	Rerata $\pm$ SB
K1	5	0,001(0,001-0,003)	
K2	5	0,000(0,000-0,002)	
P1	5		0,002 $\pm$ 0,0016
P2	4	0,007(0,005-0,009)	
P3	4	0,0015(0,000-0,003)	

Kelompok K1, K2 dan P1 memiliki jumlah sampel 5 ekor sedangkan P2 dan P3 memiliki jumlah sampel 4 ekor. Berdasarkan tabel di atas menunjukkan nilai median tertinggi terdapat pada kelompok P2 dengan nilai 0,007 serta nilai minimum 0,005 dan nilai maksimum 0,009 sedangkan nilai median terendah pada kelompok K2 dengan nilai 0,000 serta nilai minimum 0,000 dan nilai maksimum 0,002. Kelompok P1 mempunyai rerata 0,002 dan simpangan baku 0,0016.

Kadar peroksida makrofag dilakukan uji normalitas menggunakan Saphiro-Wilk dan didapatkan data berdistribusi tidak normal dengan  $p < 0,05$  lalu dilanjutkan uji Kruskal-Wallis. Uji Kruskal Wallis didapatkan  $p < 0,05$  yaitu  $p = 0,018$ , hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar peroksida yang bermakna. Uji statistik kemudian dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok. Perbedaan signifikan apabila didapatkan nilai  $p < 0,05$ .

**Tabel 2**

<b>Kelompok</b>	<b>Kontrol II</b>	<b>Perlakuan I</b>	<b>Perlakuan II</b>	<b>Perlakuan III</b>
Kontrol I	0,142	0,502	0,010*	0,793
Kontrol II	-	0,129	0,012*	0,418
Perlakuan I			0,014*	0,612
Perlakuan II				0,018*

Keterangan: \* Signifikan  $p < 0,05$

Kadar peroksida makrofag antara kelompok kontrol I dan perlakuan II terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai  $p=0,01$ . Perbedaan bermakna juga ditemukan antara kelompok kontrol II dengan perlakuan II ( $p=0,012$ ), kelompok perlakuan I dengan perlakuan II ( $p=0,014$ ) dan perlakuan II dengan perlakuan III ( $p=0,018$ ). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol I dengan kelompok kontrol II, kontrol I dengan perlakuan I, kontrol I dengan perlakuan III, kontrol II dengan perlakuan I, kontrol II dengan perlakuan III, dan perlakuan I dengan perlakuan III.

## **PEMBAHASAN**

Peningkatan kadar peroksida dimulai dari respon imun natural dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA dan diikuti oleh pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi inang terhadap infeksi. Infeksi Salmonella Typhimurium akan mengaktifkan sistem imun. Sistem imun yang digunakan untuk melawan bakteri Salmonella Typhimurium adalah sistem imun spesifik dan non spesifik. Sistem imun spesifik terdiri atas humoral dan seluler. Humoral dipengaruhi oleh sel B sebagai memori, sedangkan seluler dipengaruhi oleh sel T yang terdiri dari CTL, Tdth, Th1, Th 2, dan Th 3. Sistem imun non spesifik melibatkan makrofag.

Pemberian ekstrak daun sirih merah terbukti meningkatkan produksi peroksida makrofag dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak daun sirih merah sehingga hal ini sejalan dengan hipotesis penelitian. Kadar peroksida terendah didapat pada kelompok kontrol 2 (kelompok yang tidak diberi ekstrak daun sirih merah), hal itu kemungkinan disebabkan penurunan respon imun adaptif karena proses imunitas adaptif pada umumnya bekerja 4-7 hari setelah terjadinya infeksi dan akan berangsur menurun pada hari berikutnya. Pemberian ekstrak daun sirih merah pada kelompok perlakuan 2 dengan dosis 30 mg/hari menunjukkan peningkatan kadar peroksida dengan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan

kelompok lain sedangkan pada kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 3 terdapat peningkatan tidak signifikan. Peningkatan kadar peroksida pada mencit yang diberikan ekstrak sirih merah dapat disebabkan karena kandungan senyawa aktif dalam ekstrak daun sirih merah terutama flavonoid.<sup>11</sup>

Senyawa flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (Specific Makrofag Activating Factor) yang dapat mengaktifkan makrofag sehingga makrofag mengalami peningkatan metabolik, motilitas dan aktivitas fagositosis secara cepat dan lebih efisien dalam membunuh mikroorganisme patogen.<sup>7,8</sup> Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Yustina Sri Hartini, dkk 2014 mengenai Efek Imunomodulator Dua Senyawa Neolignan Hasil Isolasi dari Ekstrak methanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang membuktikan bahwa sirih merah dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.<sup>12</sup> Peningkatan aktivitas makrofag nantinya akan berpengaruh terhadap peningkatan kadar peroksida makrofag.<sup>6,9,10</sup>

Peningkatan kadar peroksida dengan perbedaan yang tidak signifikan tampak pada kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 3. Kelompok perlakuan 1 terdapat kenaikan tidak signifikan kemungkinan karena dosis yang belum optimal. Kelompok perlakuan 3 mengalami kenaikan tidak signifikan dari kontrol 2 namun terdapat penurunan kadar peroksida dibandingkan kelompok perlakuan 2. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh mekanisme sebagai imunomodulator yang akan meningkatkan respon imunitas hanya sampai batas tertentu yang apabila batas itu sudah tercapai maka penambahan dosis lebih lanjut tidak memberikan efek yang berarti. Faktor lain adalah sistem imun memiliki mekanisme homeostasis yang menjaga agar tidak terjadi peningkatan respon imun yang berlebihan yang dapat menyerang jaringan tubuhnya sendiri karena peroksida yang berlebihan dapat mengakibatkan kerusakan jaringan tubuh.<sup>11</sup> Penelitian ini mengalami keterbatasan yaitu tidak terdapat kelompok kontrol yang hanya diberi pakan standar tanpa diberi perlakuan apapun sehingga tidak dapat menilai apakah pemberian *Salmonella Typhimurium* saja atau ekstrak sirih merah saja berpengaruh terhadap kadar peroksida makrofag.

## **SIMPULAN DAN SARAN**

### **Simpulan**

Pemberian ekstrak daun sirih merah secara per oral dengan dosis 10, 30, dan 100 mg/mencit/hari selama 14 hari meningkatkan produksi peroksida makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella Typhimurium* dibanding dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak sirih merah. Dosis optimum daun sirih merah untuk meningkatkan kadar peroksida makrofag adalah dosis 30mg/hari/mencit.

### **Saran**

Penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan efek sirih merah. Perlu dilakukan penelitian dengan desain serupa terhadap potensi ekstrak daun sirih merah dengan dosis yang lebih bervariasi, rentang waktu pemberian ekstrak, dan infeksi bakteri yang berbeda serta perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan hanya diberikan pakan standar. Uji toksisitas dosis ekstrak daun sirih merah juga perlu dilakukan.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Kementerian Kesehatan RI. Situasi diare di Indonesia. 2011. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI: 2011.
2. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran UI. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: Bina Rupa Aksara; 2010.
3. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Pedoman pelaksanaan uji klinik obat tradisional 1st ed. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. 1-12 p.
4. Yulianti E, Rahayu T, Mercuriani IS. Potensi ekstrak sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebagai antikanker. *J Penelit dan Pengemb Pemerintah Provinsi DIY*. 2010;2(2):34–40.
5. Wicaksono BD, Handoko YA, Arung ET, Kusuma IW, Yulia D, Pancaputra AN, et al. Antiproliferative effect of the methanol extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav leaves on human breast (T47D) cells in-vitro. *Trop J Pharm Res*. 2009;8(August):345–52.
6. Hartini YSRI, 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):108–15.

7. Nopitasari RRDA. Pengaruh pemberian ekstrak buah Phaleria papuana terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit Balb/c. 2006.
8. Ajizah A. Sensitivitas Salmonella Typhimurium terhadap ekstrak daun psidium guajava. Bioscientiae. 2004;1(1):31–8.
9. Rasyid R, Yanwirasti, Nasul E. Pengaruh estrogen terhadap aktifitas sel makrofag dalam memfagosit Candida albicans secara in vitro. Maj Kedokt Andalas. 2008;32(1):75–85.
10. Kumala S, Triana EE. Efek Immunomodulator ekstrak daun ketepeng china ( Cassia alata L .) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. Makara Kesehat. 2007;11(2):50–3.
11. Setyawan AB, Winarto, Lestari ES. Pembuktian ekstrak daun kejobeling dalam meningkatkan sistem imun. J Kesehat Masy. 2016;11(2):96–100.
12. 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. Trop J Pharm Res. 2014;13(October):1609–14.