

AKTIVITAS PROLIFERASI LIMFOSIT LIEN MENCIT GALUR *Swiss* AKIBAT PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL *Phyllanthus niruri*

Akrom

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

INTISARI

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek imunostimulansia ekstrak etanol Herba meniran (*Phyllanthus niruri*) (EEP) pada mencit *Swiss* jantan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol *P. niruri*, yang diduga sebagai imunomodulator, terhadap aktivitas proliferasi limfosit lien mencit *Swiss* jantan.

Menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium pada 15 ekor mencit *Swiss* dibagi dalam 5 kelompok. Untuk kelompok pertama, sebagai control negative, mendapatkan air. Kelompok 2 sampai 4 sebagai kelompok perlakuan mendapatkan 5, 10 dan 100 mg/kgBB/hari EEP. Kelompok 5 mendapatkan vaksin *P. berghei* stadium eritrosit sebagai control positif. Perlakuan diberikan selama 14 hari. Pada hari keempat belas hewan coba dibunuh diisolasi limfosit splenosit. Aktivitas proliferasi limfosit dinilai dengan MTT assay kemudian dibaca dengan ELISA reader. Data diolah dengan program SPSS, perbedaan rata-rata antar kelompok dinilai dengan uji ANOVA satu jalan.

Ekstrak etanol *P. niruri* 5 mg/kgBB/hari lebih meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit limpa mencit *Swiss* jantan dibandingkan dengan ekstrak etanol *P. niruri* 10 dan 100 mg/kgBB/hari. Tetapi perbedaan antar kelompok perlakuan ini tidak bermakna secara statistik. Tetapi perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$). Disimpulkan bahwa 5 mg/kgBB/hari EEP memberikan efek peningkatan aktivitas proliferasi limfosit limpa mencit *Swiss* yang diinfeksi *P. berghei* yang lebih besar dari pada 10 dan 100 mg/kgBB/hari EEP.

Kata kunci: ekstrak etanol *P. niruri*; malaria; imunomodulator, proliferasi limfosit, limpa.

PENDAHULUAN

Limfosit merupakan komponen penting pada sistem imun, baik pada sistem seluler maupun sistem imun humoral (Warren, 1994). Limfosit merupakan 20 % dari semua lekosit dalam sirkulasi darah manusia, terdiri dari sel T dan sel B, merupakan kunci dalam fungsi kontrol sistem imun (Dale, 1994; Baratawidjaya, 2000). Limfosit memiliki kemampuan untuk membedakan benda asing dari jaringan sendiri, karena memiliki

reseptor yang terletak pada permukaan sel (TCR:Toll Receptor Cell) (Baratawidjaya, 2000). Limfosit T (sel T) berfungsi membantu sel B dalam memproduksi antibodi, mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi, mengaktifkan makrofag dalam fagositosis dan mengontrol ambang dan kualitas sistem imun (Baratawidjaya, 2000). Atas pengaruh antigen melalui sel T, sel B berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mampu membentuk dan melepas Ig dengan spesifisitas yang sama seperti reseptor

yang ada pada permukaan sel prekursorinya (Mota, 1998). Limpa merupakan salah organ yang bertanggungjawab terhadap pemenuhan kebutuhan limfosit. Bagian yang berwarna putih merupakan bagian limpa yang tersusun dari kumpulan limfosit yang tersusun oleh limfosit B maupun limfosit T (Abbas, 1994). Pada aktivitas imunitas yang meningkat akibat infeksi malaria maka ukuran limpa maupun aktivitas proliferasi limfosit limpa meningkat, oleh karena kebutuhan limfosit yang meningkat. Pemberian zat-zat imunostimulansia dapat meningkatkan respon imun inang terhadap infeksi malaria (Dale, 1994; Supargiyono, 1994; Wijayanti, 1997, 1999, 2000).

Sel limfosit T dapat diaktifkan setelah menerima sinyal yaitu berupa kompleks antigen dan interleukin-1 (IL-1). Jika sel limfosit diaktivasi maka kemudian mengalami perubahan-perubahan berturut-turut mulai dari transformasi blast atau proliferasi, kemudian berdiferensiasi baik menjadi sel efektor maupun sel memori, hingga apoptosis. Apoptosis bertanggungjawab pada mekanisme penstabilan pool limfoid yang konstan selama hidup (Hoffman, 1994; Baratawidjaya, 2000; Kresno, 2001). Kandungan senyawa kimiawi ekstrak etanol *P. niruri* yang diduga memiliki efek sebagai imunostimulansia adalah senyawa golongan flavonoid, alkaloid dan saponin (Labadie, 1986; Winarno, 1993; Subramoniam, 2000; Middleton, 2000).

Phyllanthus niruri adalah tanaman yang selama ini dipakai secara luas sebagai antimalaria oleh masyarakat di daerah endemic malaria (Sangat, 2000; Subarnas, 1993). Terbukti *P. niruri* memiliki efek sebagai antiplasmodial dan sebagai imunomodulator (Ma'at, 1996; Ignacio, 2001). Ma'at (2001) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *P. niruri* dosis rendah pada mencit sehat meningkatkan daya imunitas, baik imunitas humoral maupun imunitas seluler. Dimana hal itu ditandai dengan peningkatan kadar *interferon* ?, kadar ROI dan aktivitas fagositosis makrofag maupun IgG dan IgM. Ekstrak segar *P. tenellus* (*niruri*) yang disuntikkan intraperitoneal dua kali sehari sebanyak 10 mg/Kg dan 50 mg/ Kg terbukti meningkatkan aktifitas makrofag dalam memproduksi NO (Ignacio, 2001). Pada uji klinis *P. niruri* menunjukkan efektivitas yang lebih pada

terapi herpes zoster maupun ISPA jika dibandingkan dengan plasebo (Kurniati, 2002). Diduga perbaikan tersebut oleh karena efek imunostimulansia *P. niruri* yang banyak mengandung senyawa flavonoid, polifenol maupun alkaloid (Labadie, 1986; Subarnas, 1993; Kurniati, 2002).

Berdasarkan latar belakang yang dijelaskan diatas maka permasalahan penelitian yang diajukan pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol *P. niruri* terhadap aktivitas proliferasi limfosit limpa mencit *Swiss*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol *P. niruri* terhadap aktivitas proliferasi limfosit limpa mencit *Swiss* jantan.

METODE PENELITIAN

Alat

Pada penelitian ini digunakan peralatan antara lain: Inkubator CO₂, *sentrifuse*, *microplate reader*, *inverted microscope*, kamera, minor set, spuit injeksi 10 cc, *laminar air flow hood*, timbangan, alat gelas, hemositometer ; pipet , objek glas; alat ekstraksi yang terdiri dari seperangkat alat *soxhlet*, *rotaevaporator*, *waterbath* dan cawan porselin, MTT Assay dan ELISA Reader.

Bahan

Bahan utama yang dipergunakan pada penelitian ini antara lain: Ekstrak etanol *P. niruri*; *Crude vaksin P. berghei* stadium eritrosit diperoleh dari lab. Parasitologi UGM; Medium tumbuh, dimana medium tumbuh yang digunakan untuk kultur sel makrofag adalah medium RPMI - 1640 (GIBCO) yang mengandung: 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS); 1 mM *sodium Bicarbonat*; 2 mM *L-Glutamin*; 100 u *Penicillin* dan 0,5 mg *streptomycin*; bahan untuk MTT Assay antara lain larutan 3 (4,5-*dimethylthiazol* - 2y1) -2,5 *diphenyltetraziolium bromide* (*MTT sigma*); *Giemsa*:

Hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit *Swiss* jantan yang berumur 8 -

10 minggu dengan berat berkisar 20 – 30 gram yang masing-masing diperoleh dari laboratorium parasitologi FK UGM dan Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM. Mencit dipelihara dalam sangkar besi berukuran 50 x 30 x 20 cm, tiap sangkar berisi 8 ekor mencit, diberi makan pellet 529 dan diberi minum secukupnya (Wijayanti, 1997).

Jalannya Penelitian

1. Persiapan hewan coba

Mencit galur Swiss jantan berumur 6 - 8 minggu yang dipilih secara acak dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 15 ekor. Kelompok I adalah mencit yang diberi air, sebagai kontrol negatif. Kelompok II adalah mencit dengan pemberian ekstrak etanol *P. niruri* 10 mg/Kg BB/hari. Kelompok III adalah mencit dengan pemberian ekstrak etanol *P. niruri* sebesar 100 mg / kg BB/hari. Kelompok IV adalah tikus dengan vaksin *P. berghei* stadiu eritrosit sebagai kontrol positif. Pemberian vaksin sebagai imunisasi dilakukan dengan cara suntikan intraperitoneal 0, 2 ml crude vaksin *P. Bergei* yang mengandung 2×10^8 parasit ekstraseluler ditambah dengan 0,2 ml *freuds complete adjuvant* (FCA) dan di *booster* 2x dengan vaksin yang sama ditambah *freuds incomplete adjuvant* (FICA). *Booster* dilakukan dengan selang waktu 2 minggu. Pemberian ekstrak etanol *P. niruri* dilakukan dengan cara membuat larutan ekstrak etanol *P. niruri* sebesar 200 mg / cc. Pemberian larutan *P. niruri* dilakukan secara peroral menggunakan kanula intragastrikum tiap hari selama 14 hari (Ratnaningsih, 2001).

2. Isolasi limfosit limpa

Limpa (lien) diambil dari rongga abdomen begitu peritonium dibuka, setelah mencit dinarkosa dengan kloroform. Lien terletak dibagian belakang rongga abdomen, dibalik lambung dibawah hepar. Setelah mencit dinarkosa dengan kloroform dan diyakini sudah mati, lalu bulu dan kulit dinding abdomen di semprot alkohol agar steril dan mulai dilakukan pem- bedahan dinding abdomen lapis demi lapis dengan menggunakan pisau dan pinset sampai membuka kantong peritonium. Setelah peritonium terbuka dan

nampak isi abdomen, dengan menggunakan pinset organ abdomen yang menutupi limpa disingkirkan dan setelah tampak organ limpa yang berwarna merah tua kehitaman dicari pangkalnya kemudian dipotong. Setelah lien terangkat, kemudian dibersihkan dari jaringan ikat penyerta. Kemudian limpa diletakkan pada cawan petri steril yang berisis 5 ml RPMI. Limpa dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Secara hati-hati limpa dicabik-cabik dengan menggunakan pinset steril untuk mendapatkan suspensi sel tunggal, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, disentrifus pada 1200 rpm 4 C selama 10 menit. Pellet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml *tris Buffered Ammonium Kloride* (TBAH) untuk melisis eritrosit. Sel dicampur menggunakan pipet dan didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit. Ditambahkan 1 ml *Fetal Bovine Serum* (FBS) pada dasar tabung menggunakan pipet. Suspensi tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm 4° C selama 5 menit, dan supernatannya dibuang. Pellet dicuci dengan RPMI 2 x dengan cara dipipet berulang-ulang dan disentrifus pada 1200 rpm 4° C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sel diresuspensikan dengan medium komplit. Sel dihitung menggunakan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan trypan blue. Splenosit dikultur pada mikrokultur 24 sumuran dengan kepadatan 10^6 sel / ml dalam medium komplit kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 %, 37 C selama 72 jam.

3. Pengujian aktivitas proliferasi limfosit supernatan kultur splenosit.

Aktivitas proliferasi supernatan kultur splenosit diukur dengan MTT Assay. Prosedur pemeriksaan adalah sebagai berikut: (a). Kultur supernatan limfosit 72 jam ditambah dengan MTT assay kemudian diinkubasi didalam inkubator CO₂ selama 4 jam; (b). Setelah 4 jam diambil dan dihentikan aktivitas proliferasi dengan menambahkan larutan penyetop karbol; (c). Hasil penyetopan kemudian dibaca dengan Elisa reader.

Analisa varian (ANAVA) satu jalan digunakan untuk menguji perbedaan secara keseluruhan rerata antar kelompok dalam penelitian tak berpasangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas proliferasi limfosit diuji dengan *MTT assay*. Hasil dari pengamatan uji proliferasi

rerata jumlah limfosit limpa antar kelompok itu adalah bermakna ($p < 0,05$).

Tabel I. Rerata absorbansi lima kelompok limfosit mencit *Swiss* setelah pemberian ekstrak etanol *P. berghei* dengan metode *MTT Assay* dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm

Kelompok mencit	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation
Kel I	0,2 ml air/hari	3	0,29	0,03
Kel.II	5 mg/kgbb/hari EEPN	3	0,4	0,01
Kel. III	10 mg/kgbb/hari EEPN	3	0,37	0,08
Kel. IV	100 mg/kgbb/hari EEPN	3	0,36	0,1
Kel. V	0,2 ml vaksin <i>P. berghei</i> stadium eritrosit	3	0,43	0,03

limfosit tampak pada tabel 1. Secara umum aktivitas proliferasi limfosit mengalami peningkatan tajam pada pemeriksaan yang kedua yaitu terjadi pada hari ke-5 setelah infeksi. Pada pemeriksaan yang ketiga sudah mengalami penurunan dibandingkan dari pemeriksaan yang kedua tetapi tetap lebih tinggi dibandingkan pada pemeriksaan pertama. Proliferasi limfosit pada kelompok vaksin merupakan yang tertinggi dan kelompok air yang terendah. Proliferasi limfosit pada kelompok 100 mg/kgbb/hari EEPN lebih rendah dibandingkan yang terjadi pada kelompok 10 mg/kgbb/hari EEPN, tetapi lebih tinggi dari kelompok air. Dengan uji anova diketahui bahwa perbedaan aktivitas proliferasi limfosit yang terjadi pada kelompok vaksin, EEPN 100 dan EEPN 10 dibandingkan dengan kelompok air adalah berbeda secara sangat bermakna ($p,01$). Tetapi perbedaan yang terjadi pada kelompok EEPN 100 dengan EEPN 10 kurang bermakna secara statistik.

Jumlah limfosit lien dihitung dengan menggunakan bilik hitung dengan bantuan mikroskop cahaya. Jumlah limfosit yang terdapat pada limpa setelah diinfeksi *P. berghei* pada pengamatan hari ke-2, ke-5 dan ke-7 terlihat pada tabel 2. Dimana jumlah limfosit kelompok vaksin dan kelompok EEPN 10 adalah yang tertinggi sementara jumlah limfosit kelompok air adalah yang paling rendah. Secara statistik perbedaan

PEMBAHASAN

Saah satu cara untuk mengetahui respon imun dari hospes adalah dengan uji transformasi blast. Limfosit yang mengalami stimulasi akan mengalami perubahan biokemis maupun morfologis. Secara biokemis terjadi pertambahan kecepatan metabolisme oksidatif, sintesis protein dan RNA. Setelah 2-4 jam protein spesifik yang diduga meregulasi proliferasi mulai terdeteksi dalam inti. Secara morfologis terjadi perubahan yang disebut transformasi blast dengan tanda-tanda diameter sel bertambah, kromatin menjadi longgar dan terpulas pucat. Dalam waktu 8-12 jam perubahan ini sudah dapat dilihat dengan mikroskop cahaya sebagai limfoblast (Stites, 1990; Wijayanti, 1999; Kaufmann, 2002). Dengan demikian transformasi blast dapat dipakai sebagai penanda bahwa limfosit terpacu oleh mitogen atau antigen. Sebagai hasil akhir ini semua adalah peningkatan jumlah sel limfosit limpa (Abbas, 1994; Janeway, 1994; Hoffman, 1994; Fitri, 1996; Wijayanti, 1997; Sheehan, 1997).

Kemampuan proliferasi limfosit pada mencit kelompok EEPN 100 mg/kgbb/hari, EEPN 10 mg/kgbb/hari dan vaksin bukan hanya dipacu oleh PHA tetapi juga oleh adanya antigen *Plasmodium* dan imunostimulan yang dikandung ekstrak etanol *P. niruri*. Sementara itu mencit kelompok air, stimulasi mitogen hanya berasal

dari PHA dan antigen dari *Plasmodium*, sehingga aktivitas proliferasi limfosit mencit kelompok air lebih rendah dibandingkan dengan ketiga kelompok lainnya. Kelompok vaksin adalah kelompok yang memiliki aktivitas proliferasi limfosit yang paling tinggi. Hal ini sesuai dengan apa yang didapatkan oleh Wijayanti (1997) dimana mencit kelompok vaksin dibandingkan mencit kelompok air memiliki tingkat proliferasi limfosit yang lebih tinggi (Wijayanti, 2000). Dari penelitian ini juga diketahui kemampuan proliferasi limfosit limpe mencit kelompok EEPN 10 mg/kgbb/hari lebih baik dari kelompok EEPN 100 mg/kgbb/hari meskipun secara statistik tidak bermakna.

Peningkatan aktivitas proliferasi limfosit limpa pada kelompok vaksin dan kelompok EEPN 10 mg/kgbb/hari serta EEPN 100 mg/kgbb/hari diikuti dengan kenaikan jumlah limfosit limpa. Secara bermakna terjadi kenaikan jumlah limfosit pada kelompok vaksin, kelompok EEPN 10 mg/kgbb/hari dan kelompok EEPN 100 mg/kgbb/hari. Kenaikan tertinggi dari rerata jumlah limfosit limpa pada pengamatan yang kedua, yaitu setelah mencit diinfeksi selama 5 hari. Pengamatan ketiga yang dilakukan pada infeksi hari ke-7 menunjukkan telah terjadi penurunan respon imun, dimana tingkat proliferasi dan jumlah limfosit limpa mengalami penurunan kembali sebagaimana pada pengamatan yang pertama, hal ini menunjukkan bahwa mulai hari ketujuh tampaknya respon imun mulai melemah diakibatkan oleh tingginya tingkat infeksius *Plasmodium* bersama toksin-toksin yang dihasilkan sehingga sistem pertahanan tubuh tidak mampu lagi untuk memberikan perlawanan. Hal itu sesuai dengan yang didapatkan oleh Wijayanti (1997) bahwa pada hari kesembilan biasanya mencit Swiss yang diinfeksi *P. berghei* akan mengalami tingkat parasitemia paling tinggi pada mencit yang tidak memiliki sistem pertahanan yang lebih kuat dibandingkan tingkat infeksius parasit (Supargiyono, 1994; Wijayanti, 1997). Kandungan bioaktif beberapa tanaman telah terbukti memiliki efek sebagai imunomodulator termasuk sebagai imunostimulan, sehingga tanaman-tanaman tersebut bisa dikembangkan sebagai terapi ajuvan pada kasus – kasus infeksi

termasuk infeksi malaria (Dale, 1994; Subramoniam, 2000; Middleton, 2000; Ma'at, 2001).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan uraian pada pembahasan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *P. niruri* dosis 5 mg/kgbb/hari lebih kuat dalam meningkatkan proliferasi limfosit Swiss jantan dibandingkan dosis 100 maupun dosis 10 mg/kgbb/hari EEPN.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. 1994. *Cellular and Molecular Immunology*. Second Ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company
- Baratawidjaja, K.G. 2000. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Dale, M. M., Foreman, J. C. and Fan, T.D. (ed.) 1994. *Textbook of Immunopharmacology*. Oxford : Blackwell Scientific Publications.
- Fitri, L.K. 1996. *Kaitan antar kadar interferon ? dan Tumor Necrosis Factor dengan imunitas terhadap infeksi malaria*. Jogjakarta : Pasca Sarjana UGM.
- Hoffman, S.L., Sedegah, M. and Malik, A. 1994. Cytotoxic T Lymphocytes in Humans Exposed to *Plasmodium Falciparum* by immunization or Natural Exposure. Dalam Oldstone, M. B. A. (eds). *Cytotoxic T Lymphocytes in Humans viral and Malaria Infections*. London : Springer Verlag.
- Ignacio, S.R. et al. 2001. *Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with phyllanthus tenellus extracts*. *J. Ethnopharmacol*, 74, 2, 181 - 7.
- Janeway, C. H. et al. 1994. *Immunobiology the immune system in health and disease*. London : Current Biology Ltd.
- Kaufmann, S. H. E., Sher, A. and Ahmed, R. (ed.) 2002. *Immunology of Infectious Disease*. Washington DC : ASM Press.
- Klein, J. 1991. Defence reactions mediated by phagocytes. Dalam J. Klein . *Immunology*. Oxford : Black well Scientific Publications.