

Pengaruh Meniran (*Phyllanthus niruri L*) Terhadap Patogenesis Infeksi Salmonella

Sunarno

Puslitbang Biomedis dan Farmasi
Badan Litbang Kesehatan, Depkes R.
E-mail: no_nar@yahoo.com

Abstract

Typhoid/paratyphoid disease is a major problem in Indonesia. Management of therapy including the use of immunomodulator must be developed continuously. In this case Phyllanthus niruri L is immunomodulator that has been useful to increase the animal and human immunity. The purpose of this study was to know the influence of Phyllanthus niruri L on the Salmonella infection focusing on spleen bacterial colonies. The experiment was designed with post test-only control group to 18 Bab/C Mice infected by Salmonella typhimurium divided into one control group and two experimental groups which have given Phyllanthus niruri L of 3x 0.125 mg/day (P1) and 3x 0.25 mg/day (P2) orally. Statistical analysis was used Oneway ANOVA test. The research result showed that treatment P1 had significant influence to decrease spleen bacterial colonies compared to control group.

Key Words: *Phyllanthus niruri L, Immunomodulator, Salmonella*

Pendahuluan

Salah satu penyakit infeksi yang masih menjadi masalah utama di Indonesia adalah demam typhoid/paratyphoid, terbukti dalam dekade terakhir insiden penyakit typhoid mencapai 350 – 810 per 100.000 penduduk per tahun.^{1,2} Selain itu penyakit ini merupakan penyebab terbanyak dari seluruh kasus demam yang dirawat di rumah sakit.³ Bahkan hasil Riskesdas 2007 menunjukkan prevalensi penyakit typhoid yang terdiagnosa tenaga kesehatan saja mencapai 300 – 1600 per 100.000 penduduk per tahun.⁴

Penyakit typhoid/paratyphoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* atau *paratyphi*. *Salmonella* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, bersifat motil dan patogenik dengan karakteristik pertumbuhan menghasilkan fermentasi glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, oksidase (-), katalase (+), tidak membentuk spora, dan fakultatif aerobik.² Membran sel tersusun atas kompleks gliko-

lipid yang disebut lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin, terdiri dari 3 lapisan yaitu *O-specific polysaccharide* di bagian luar, *core-polysaccharide* di bagian tengah dan *lipid A* di bagian dalam. Dengan struktur LPS yang demikian lengkap menjadikannya lebih resisten terhadap komplemen jalur *membrane attack complex (MAC)* dan dapat merintangi aktivasi sel T, khususnya CD4 yang lebih mengenali epitop peptida daripada polisakarida.⁵ *Salmonella* juga mampu bertahan hidup dan bermultiplikasi dalam makrofag yang memfagositnya.⁶

Penatalaksanaan penyakit typhoid harus dilakukan dengan cepat dan tepat. Keterlambatan penanganan bisa mengakibatkan terjadinya komplikasi berat berupa perforasi usus, peritonitis, penurunan kesadaran sampai dengan kematian.² Oleh karena itu metode pengobatan yang efektif perlu terus diupayakan, termasuk di antaranya penggunaan imunomodulator. Dalam hal ini *Phyllanthus niruri L* (Meniran) merupakan salah satu imunomodulator yang telah teruji dalam meningkatkan imunitas

pada binatang percobaan dan manusia serta bermanfaat untuk pengobatan infeksi virus maupun bakteri. Pada infeksi bakteri biasanya digunakan sebagai *adjuvant* (terapi pendamping) antibiotik.⁷

Sejalan dengan hal tersebut peneliti ingin menguji efek imunomodulator *Phyllanthus niruri L* pada patogenesis infeksi *Salmonella*. Sebagaimana telah diketahui bahwa untuk mengatasi penyakit ini dibutuhkan sistem imun yang kuat yang dapat ditingkatkan dengan efek imunomodulator *Phyllanthus niruri L*. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* terhadap patogenesis infeksi *Salmonella* sehingga hasilnya diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan dalam terapi typhoid.

Metode

Rancangan penelitian ini menggunakan model mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal. Hal ini menyebabkan penyakit sistemik yang serupa dengan typhoid pada manusia. Pemilihan model penelitian dengan menggunakan hewan coba (mencit) karena dalam penelitian ini dilakukan pengambilan organ limpa sehingga tidak dapat dilakukan pada manusia. Sedangkan alasan penggunaan *serotype typhimurium* karena *serotype typhi* dan *paratyphi* seringkali tidak dapat menyebabkan penyakit pada hewan kelas rendah seperti mencit.⁸

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi FK Undip pada bulan April – Mei 2007. Metode yang digunakan adalah eksperimen laboratorium dengan rancangan *the post test-only control group*. Perlakuan berupa pemberian larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* yang berasal dari Laboraturum Pengujian Mutu Bahan Baku Obat Alam dan Agro Industri Universitas Diponegoro dengan dosis bertingkat pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan bakteri *Salmonella typhimurium* 10⁵ CFU (dari Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro).

Dosis pemberian larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* didasarkan pada konversi dosis menurut Laurence & Bacharach (1964) yaitu dosis manusia dikali 0,0026 sehingga didapatkan dosis untuk mencit 3 x 130 µg/hr. Untuk memudahkan pengenceran maka dibuat rentang dosis yaitu 3 x 125 µg/hr dan 3 x 250 µg/hr.

Sampel berjumlah 18 ekor. Setelah diadaptasi selama 1 minggu, dibagi dalam 2 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Pengelompokan menggunakan metode acak sederhana dengan jumlah sampel masing-masing kelompok 6 ekor. Kriteria inklusi sampel meliputi: galur murni, jenis kelamin jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-30 gram, sebelum diinfeksi *Salmonella typhimurium* dalam kondisi sehat. Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan sampel adalah mencit mati sebelum tiba waktu observasi. Parameter pengukuran variabel berupa jumlah koloni bakteri organ limpa yang dikultur dalam media *Salmonella-Shigela Agar*. Data dicatat menggunakan lembar observasi dan dianalisis secara statistik menggunakan uji *One way ANOVA* dengan bantuan program SPSS.

Hasil dan Pembahasan

Gambaran umum hasil penelitian dan hasil analisis statistik menggunakan uji *Oneway ANOVA* dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1. terlihat bahwa selisih rata-rata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 adalah 116, antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 adalah 54,83, dan antara kelompok perlakuan-1 dengan -2 adalah 61,17.

Uji statistik dengan *Oneway ANOVA test* menunjukkan nilai $p \leq 0,05$. Ini berarti hipotesis nol ditolak sehingga diambil kesimpulan bahwa ada perbedaan rata-rata jumlah koloni bakteri limpa antar kelompok. Oleh karena itu dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc test (LSD)* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Hasil *multiple comparisons* dengan *Post Hoc test (LSD)* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Gambaran dan Analisis Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri Limpa

Variabel	Kontrol (CFU/gr)	Perlakuan-1 (CFU/gr)	Perlakuan-2 (CFU/gr)	p. value*)
Koloni Bakteri				0,002
- Minimum	65	5	76	
- Maksimum	229	85	119	
- Mean	152,5	36,5	97,67	
- SD	58,2	28,56	21,5	

Keterangan:

Kontrol : tanpa pemberian *Phyllanthus niruri L*

Perlakuan-1 : pemberian *Phyllanthus niruri L* dosis 3 x 125 µg/hari

Perlakuan-2 : pemberian *Phyllanthus niruri L* dosis 3 x 250 µg/hari

*) Uji *Oneway ANOVA*; CFU = *Colony Forming Unit*

Tabel 2. Hasil *Post Hoc test (LSD)* Jumlah Koloni Bakteri Limpa

N=17	Kontrol	Perlakuan-1	Perlakuan-2
ontrol	-	0,001	0,095
Perlakuan 1	0,001	-	0,066
Perlakuan 2	0,095	0,066	-

Keterangan: sama dengan Table 1.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p \leq 0,05$. Sementara itu antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Meskipun demikian secara substansi terdapat perbedaan rata-rata yang cukup besar, yaitu 54,83. Begitu juga antara kelompok perlakuan-1 dengan -2, tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Phyllanthus niruri L* berperan dalam menghambat patogenesis infeksi *Salmonella*. Sebagaimana tampak pada Tabel 2, antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapatkan *Phyllanthus niruri L* dengan dosis 3 x 0,125 mg terdapat perbedaan yang signifikan pada hitung koloni bakteri limpa, di mana nilai pada kelompok yang diberi *Phyllanthus niruri L* lebih rendah daripada yang tidak. Hal ini karena adanya efek imunomodulator dari *Phyllanthus niruri L* yang da-

pat meningkatkan fungsi sistem imun⁷ untuk mengeliminasi bakteri *Salmonella* sehingga meminimalisasi jumlah bakteri yang menginvasi limpa.

Sementara itu pada kelompok perlakuan-2 dengan dosis 3 x 0,25 mg tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dapat terjadi karena sedikitnya jumlah sampel. Pernyataan ini didukung adanya bukti bahwa meskipun secara statistik tidak ada perbedaan, tetapi secara substansi terdapat selisih rata-rata yang cukup besar, yaitu 54,83. Selain itu secara statistik perlakuan-2 juga tidak berbeda dengan kelompok perlakuan-1 (yang berbeda dari kelompok kontrol). Kenyataan lain adalah adanya perbedaan pada gambaran histopatologi hepar antar 2 kelompok dengan perlakuan yang sama.⁹

Semakin kuat sistem pertahanan/ imunitas tubuh maka akan semakin kecil kesempatan bakteri untuk lolos dan mencapai organ limpa. Sekitar 1 jam setelah diinfeksi secara intravena atau intraperitoneal (Fase I), lebih dari 90% kuman di-

tangkap dan dirusak oleh fagosit residen. Pada Fase II yang disebut dengan tahap pertumbuhan eksponensial, kuman masuk ke dalam sirkulasi melalui pembuluh limfe, kemudian melakukan invasi dan bermultiplikasi di hepar dan limpa. Neutrofil sangat penting pada fase ini sebagai pertahanan host dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada Fase III yang terjadi setelah 3-7 hari, bakteri tumbuh pesat dan menetap di hati dan limpa. Makrofag yang teraktivasi memproduksi sitokin proinflamasi untuk meningkatkan *killing* sel NK. Fase pembersihan terjadi setelah minggu ketiga infeksi dengan melibatkan imun adaptif.¹⁰

Infeksi *Salmonella* menyebabkan limpa mengalami hiperplasia dan hipertropi akibat proliferasi limfosit di pulpa merah serta infiltrasi neutrofil dan makrofag ke dalam limpa. Aktivasi limfosit limpa disebabkan oleh respon imun dan peran makrofag serta sel NK dengan dikeluarkannya sitokin seperti IFN γ dan TNF α . Pada gambaran histopatologi mungkin tampak splenitis, nekrosis multifokal dan sering disertai dengan koloni bakteri.¹ Sedangkan pada pemeriksaan fisik akan teraba splenomegali.²

Respon imun terhadap salmonella meliputi sistem imun natural (*innate*) dan sistem imun adaptif (*acquired*). Sistem imun natural berfungsi untuk mengidentifikasi dan melawan mikroba serta penanda imun adaptif.^{11,12} Respon imun natural dimulai dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti penangkapan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi host terhadap infeksi. Peran ini dilakukan oleh makrofag, sel NK, dan neutrofil.¹³ Makrofag akan bekerjasama dengan sel NK dan neutrofil untuk mengeliminasi bakteri dengan bantuan mediator inflamasi seperti TNF α , IFN γ , IL-1, -6, -8, -12, -15, dan -18. Makrofag dan neutrofil mampu melakukan fagositosis dan mencerna serta merusak bakteri secara enzimatis dan *respiratory burst*. Sementara

itu sel NK berperan untuk melisis sel yang terinfeksi sehingga bakteri yang hidup didalamnya (intrasel) dapat dieliminasi.⁵

Selain imunitas alami, sistem pertahanan host terhadap *Salmonella* juga melibatkan imunitas didapat/adaptif. Pada respon imun adaptif sel yang berperan adalah APC, sel T dan sel B. Sel T diperlukan untuk ekspresi penuh imunitas terhadap *Salmonella*. *Cluster designation 4* (CD4) berperan dalam membantu aktivasi dan diferensiasi sel B dalam membentuk anti bodi, membantu pembentukan CD8 spesifik salmonella dan pengaturan pembentukan granuloma untuk membatasi penyebaran bakteri. *Cluster designation 8* (CD8) ini dapat melisis sel yang terinfeksi dan memproduksi sitokin yang dibutuhkan untuk penerahan dan aktivasi fagosit.^{14,15}

Dalam hal ini *Phyllanthus niruri L* berfungsi untuk mengoptimalkan fungsi sistem imun. Kandungan kimia *Phyllanthus niruri L* berupa Lignan (*phyllanthine, hypophyllantine, phylltetraline, lintetralin, niranthin, nirtetralin, nirurin, niruside, niephyline*); Terpen (*cymene, limonene, lupeol, lupeol acetate*); Flavonoid (*quercetin, quercitrin, isoquercitrin, astragaline, rutine, physetinglucoside*); Lipid (*ricinoleic acid, dotriancantanoic acid, linoleic acid, linolenic acid*); Benzenoid (*methylsalisilate*); Alkaloid (*norsecurinine, 4-metoxinor securinine, entnor securinina, nirurine*); Steroid (*beta sitosterol*); Alkanes (*triacontanal, triacontanol*); dan zat lain (*vitamin C, tannin, saponin*).¹⁶

Ekstrak *Phyllanthus niruri L* telah melalui uji klinis dan pre-klinis di beberapa rumah sakit besar. Uji klinis acak buta ganda mengenai efek pemberian imunostimulan ekstrak *Phyllanthus niruri L* pada pasien infeksi saluran nafas akut oleh berbagai etiologi pada anak yang dilakukan di Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta, menunjukkan hasil yang baik terutama dalam mempercepat turunnya suhu badan. Lebih lanjut penggunaan ekstrak

Phyllanthus niruri L sebagai ajuvan dengan obat antituberkulosis juga menunjukkan perbaikan yang bermakna dibandingkan dengan plasebo. Demikian juga penelitian pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai ajuvan pada terapi varisela di Bagian Kulit RSUD Tangerang menunjukkan penyembuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan penggunaan plasebo.⁷

Phyllanthus niruri juga terbukti mampu meningkatkan kemotaksis dan fagositosis makrofag.¹⁷ Ini penting mengingat *Salmonella* mampu menghambat fusi fago-lisosom sehingga dapat bertahan hidup dalam makrofag yang memfagositnya dan bahkan mampu melakukan multiplikasi di dalam fagosom yang tidak berfusi.⁶ Selain itu *Phyllanthus niruri L* juga mampu meningkatkan kemotaksis neutrofil dan meningkatkan sitotoksik sel NK.⁷ Peran neutrofil ini terutama diperlukan pada fase ke-2, yaitu mulai hari I sampai III,¹⁸ di mana LPS dari *Salmonella typhimurium* akan mengaktifasi neutrofil, baik secara langsung maupun melalui aktifitas komplemen.¹⁹ Interaksi antara *Salmonella typhimurium* dan sel host akan memprovokasi dikeluarkannya IL-8 dan molekul proinflamasi lainnya. Sekresi IL-8 diinduksi NF- κ B yang diperantarai oleh penarikan dan peningkatan Ca^{2+} intrasel. Sedangkan peningkatan Ca^{2+} intrasel sendiri dipengaruhi oleh invasi *Salmonella* ke dalam sel. IL-8 inilah yang berperan utama dalam aktifitas marginasi dan migrasi neutrofil.²⁰

Di sisi lain, peran sel NK juga sangat dibutuhkan karena *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri intrasel yang mampu hidup dan berkembang biak di dalam sel dalam jangka waktu yang sangat lama.²¹ Sel NK akan menghancurkan sel yang terinfeksi seperti halnya CD-8 sehingga bakteri yang ada didalamnya dapat dieliminasi.⁵ Tidak sebatas itu, *Phyllanthus niruri L* terbukti mampu meningkatkan sekresi TNF α , IFN γ , dan IL-4. *Phyllanthus*

niruri L juga dapat meningkatkan proliferasi sel T dan produksi imunoglobulin M-(IgM) serta imunoglobulin G (IgG).⁷

Pada hasil penelitian ini yang menarik adalah bahwa dosis yang lebih kecil (3x 0,125 mg/hr) memberikan hasil lebih baik daripada dosis yang lebih besar (3x 0,25 mg/hr). Akan tetapi hal ini bukanlah sesuatu yang luar biasa karena hasil penelitian serupa juga terjadi pada penelitian tentang pengaruh ekstrak bawang putih terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Disebutkan bahwa kelompok dengan dosis ekstrak bawang putih 2 mg/hari mempunyai *survival rate* lebih besar dan jumlah koloni lebih rendah daripada kelompok dengan dosis yang lebih besar (4 mg/hari).¹⁸ Dengan demikian semakin tinggi dosis tidak selalu berarti semakin tinggi efek obat. Bahkan bisa muncul efek sebaliknya, seperti yang terjadi pada Aspirin sebagai obat penurun panas yang justru akan menyebabkan peningkatan panas tubuh pada dosis berlebih dan alkohol 70% sebagai antiseptik yang akan kehilangan efek antiseptiknya bila konsentrasi ditingkatkan.²²

Kesimpulan

Phyllanthus niruri L bermanfaat untuk menghambat patogenesis infeksi *Salmonella*. Hal ini dibuktikan dengan adanya perbedaan jumlah koloni bakteri limpa, di mana jumlah koloni bakteri lebih rendah pada kelompok yang mendapatkan *Phyllanthus niruri L* dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak mendapatkan *Phyllanthus niruri L*.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro beserta staf yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Rujukan

1. Prasetyo A, Gelu MFD, Yosefeta R, Nugroho DA, dan Kurniasari T. Pengaruh pemberian ekstrak *Pheretima aspergillum* terhadap perubahan histopatologi ileum, hepar, vesika fellea dan lien pada tikus Balb/ yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *M Med Indonesia*. 2005; 40:36-44.
2. Tumbelaka AR. Tata laksana demam tifoid pada anak. *Pediatrics Update*, 2003; 37-45.
3. Kanungo S, Dutta S, and Sur D. Epidemiology of typhoid and paratyphoid fever in India. *J Infect Developing Countries*. 2008; 2(6):454-460
4. Team. Laporan nasional dan propinsi hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007. Jakarta: Balitbangkes Depkes RI.
5. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, and Imboden JB. Medical immunology 10th ed. Singapore: McGraw-Hill; 2003.
6. Elhofy A and Bost KL. Limited Interleukin-18 response in *Salmonella*-infected murine macrophages and in *Salmonella*-infected mice. *Infect. Immun*. 1999; 67:5021-5026.
7. Munasir Z. Manfaat pemberian ekstrak *phyllanthus niruri* sebagai imunostimulator pada penyakit infeksi anak. 2002. Available from: URL: <http://www.tnial.mil.id/cakrawala.php3>.
8. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, and Bäumlér AJ. The Vicapsular antigen of *Salmonella enterica* serotype typhi reduces toll-like receptor-dependent Interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect. Immun*. 2005; 73:3367-3374.
9. Sunarno. Efek *Phyllanthus niruri* L pada prosentase neutrofil, koloni bakteri organ limpa dan gambaran histopatologi mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* (tesis). Semarang: Universitas Diponegoro; 2007
10. Lehner MD. Immunomodulation by endotoxin tolerance in murine models of inflammation and bacterial infection (dissertation). University of Konstanz; 2001.
11. Parry CM. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. In: Pietro Mastroeni, ed. *Salmonella infections: clinical, immunological and molecular aspects*. UK and New York: Cambridge University Press; 2006.
12. Mastroeni P and Ménager N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J Med Microbiol*, 2003; 52:453-459.
13. Criss AK, Silva M, Casanova JE, and McCormick BA. Regulation of *Salmonella*-induced neutrophil transmigration by epithelial ADP-ribosylation factor 6. *J. Biol. Chem*. 2001; 276:48431-48439.
14. Van der Velden AWM, Copass MK, and Starnbach MN. *Salmonella* inhibit T cell proliferation by a direct, contact-dependent immunosuppressive effect. *PNAS*. 2005; 102:17769-17774.
15. Cummings LA, Barrett SLR, Wilkerson WD, Fellnerova I, and Cookson BT. FliC-Specific CD4+ T cell responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. *The Journal of Immunology*. 2005; 174:7929-7938
16. Stagg J. *Phyllanthus*. 2006. Available from: URL:<http://www.supplementnews.org/phyllanthus.html>,
17. Radityawan D. Pengaruh *Phyllanthus niruri* sebagai imunomodulator terhadap kadar IFN- γ pada penderita tuberkulosis paru. *Dexa Media*. 2005; 18:94-96.
18. Purwoko Y. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* (tesis). Semarang: Universitas Diponegoro; 2003.
19. Nelwan R.H.H. Patofisiologi dan deteksi dini sepsis. *Acta Medica Indonesiana*. 2003; xxxv:15-18.
20. Gewirtz AT, Rao AS, Simon PO, Merlin D, Carnes D, Madara JL, and Neish AS. *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca²⁺-mediated activation of the NF κ -B pathway. *J Clin Invest*. 2000; 105:79-92.
21. Monack DM, Bouley DM, and Falkow S. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrp1^{+/+} Mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *JEM*. 2004; 199:231-241.
22. Ganiswarna SG, Setiabudy R, Suyatna FD, Purwastyastuti, Nafrialdi. Farmakologi dan terapi ed-4. Jakarta: FKUI; 1995.

