



PEMBUKTIAN EKSTRAK DAUN KEJIBELING DALAM MENINGKATKAN SISTEM IMUN

Annaas Budi Setyawan^{1✉}, Winarto², Endang Sri Lestari³

^{1,2,3}Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima 30 Juni 2015
Disetujui 29 September 2015
Dipublikasikan Januari 2016

Keywords:
Strobilanthes
crispus; Phagocytosis; ROI Macrophage

DOI
<http://dx.doi.org/10.15294/kemas.v11i1.3521>

Abstrak

Resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan masalah di negara berkembang maupun negara maju. Tujuan penelitian untuk melihat peningkatan fagositosis dan ROI makrofag pada mencit yang diinfeksi bakteri *S.aureus*. Penelitian dilakukan pada tahun 2014. Mencit dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok kontrol (K), mencit diinfeksi bakteri *S.aureus*. Kelompok perlakuan (P1,P2,P3), mencit diinfeksi bakteri *S.aureus* diberi ekstrak daun kejobeling dengan dosis bertingkat 150;300;600mg/kgBB. Pemberian ekstrak daun kejobeling dilakukan selama delapan hari diinjeksi bakteri *S.aureus* 108 cfu sebanyak 0,2 mL dilakukan hari pertama secara intraperitoneal. Fagositosis makrofag dilakukan uji Anova dilanjutkan uji LDS. ROI makrofag dilakukan uji Kruskal wallis dilanjutkan uji Mann whitney U. Kedua uji hipotesis didapatkan $p < 0,05$. Fagositosis makrofag uji LSD terdapat perbedaan bermakna antar kelompok (K) dengan (P1,P2,P3) dengan nilai $p = 0,001$. ROI makrofag pada uji Post Hoc dengan Mann Whitney menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok dengan nilai $p < 0,05$. Ekstrak daun kejobeling dosis 150mg/kgBB bermakna meningkatkan fagositosis makrofag dan produksi ROI.

VERIFICATION OF KEJIBELING LEAF EXTRACT IN IMPROVING THE IMMUNE SYSTEM

Abstract

*Antibacterial resistance to antibiotics is a problem both in the developing and developed countries. The aim of this experiment is to study the effect of *S. crispus* on phagocytosis and ROI of macrophage in mice peritoneum which infected with *S.aureus*. The research in 2014 used a post test only control group design consist of 24 male swiss mice which randomly signed into four group, control group (K) was infected by *S.aureus* but not given an extracts. Treatment group (P1,P2,P3) were infected by *S.aureus* 108cfu/mL and fed with *S.crispus* extracts at different dosages (150;300;600mg/kgbw). To analyzed the machropage phagocytosis activity by Anova and Kruskal wallis. The machropage phagocytosis activity on the Post Hoc using LSD test resulted in significant difference control group (K) and treatments (P1,P2,P3). This research also found an insignificant difference between P1 and P3 ($p:0.150$); P2 and P3 ($p:0.646$). ROI production on Post Hoc test using mann whitney resulted in a significant difference between groups ($p:0.05$). The 150mg/kgbw *S.crispus* extract were capable of enhancing machropage phagocytosis and ROI production in a significant manner.*

© 2016 Universitas Negeri Semarang

Pendahuluan

Infeksi nosokomial sering terjadi di ruang rawat inap. Bahkan negara besar seperti Amerika mengeluarkan dana sebesar \$ 4,1 miliar - \$11 miliar untuk mengatasi dua juta pasien/tahun yang terserang infeksi nosokomial. Banyaknya bakteri yang ditemukan resisten terhadap antibiotik dianggap sebagai penyebab infeksi nosokomial dan salah satu bakteri yang teridentifikasi sering menyebabkan infeksi nosokomial yaitu *Staphylococcus aureus* sebesar 21,7%. Saat ini diketahui sekitar 40% bakteri *S.aureus* yang dapat diisolasi di rumah sakit resisten terhadap beberapa jenis antibiotik turunan β -laktam dan sefalosporin, tetapi masih sensitif terhadap antibiotik vankomisin dan klindamisin.

Staphylococcus adalah bakteri intraseluler, sehingga sistem imun seluler berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap penyakit ini. Fagosit baik mononuklear maupun polimorfonuklear berperan dalam menghambat replikasi bakteri. Sel-sel imunokompeten dapat membunuh mikroba dengan dua cara yaitu fagositosis bakteri intraseluler oleh makrofag dan lisis sel yang terinfeksi oleh limfosit T dan sel NK (Christian, 2008). Dalam proses fagositosis terdapat tiga fase yaitu fase pengenalan, degranulasi, dan pembunuhan atau *killing*. ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*) terdiri atas radikal peroksida, radikal hidrosil dan singlet oksigen, ROI sangat reaktif dalam proses membunuh bakteri. Prosesnya sendiri terjadi beberapa saat setelah fagositosis dan dikenal sebagai *respiratory burst* (percepatan respirasi) yang terjadi karena stimulasi jalur metabolik (Baratawidjaja, 2009).

Respiratory burst dimulai dengan adanya perubahan O_2 menjadi O_2^- dengan bantuan enzim NADPH oksidase, kemudian dalam reaksi yang dikatalisis oleh *Superoksida Dismutase* (SOD), dua molekul yaitu masing-masing H^+ dan O^- dan membentuk H_2O_2 , sedangkan di netrofil H_2O_2 tersebut akan dikonversi membentuk molekul bakterisidal oleh enzim *Mieloperoksidase* (MPO). Dengan adanya Fe^{2+} maka O_2^- dan H_2O_2 akan bereaksi membentuk OH dan O_2 (singlet oksigen) yang sangat reaktif sebagai bakterisid. Dikatakan bahwa molekul-molekul diatas khususnya

H_2O_2 berperan sangat penting dalam *bacterial killing* oleh makrofag terhadap *S.aureus* karena bersifat bakterisid (Baratawidjaja, 2009).

Pengetahuan tentang khasiat dan keamanan tanaman obat di Indonesia biasanya hanya berdasarkan pengalaman empiris yang biasanya diwariskan secara turun temurun dan belum teruji secara ilmiah. Untuk itu diperlukan penelitian tentang obat tradisional, sehingga nantinya obat tersebut dapat digunakan dengan aman dan efektif. Sekitar 80% individu dari negara berkembang menggunakan pengobatan tradisional dengan bahan yang berasal dari tanaman obat. Penggunaan ekstrak dan zat fitokimia tanaman yang memiliki kandungan antimikroba dapat menjadi dasar penemuan antibiotik baru dalam terapi kasus infeksi bakteri (Nugrahani, 2012).

Ekstrak daun kejibeling memiliki aktivitas yang tinggi sebagai antibakteri, secara invitro terbukti terhadap bakteri *S.aureus* dan *Bacillus cereus* (Muskhazli, 2009). Aktivitas antibakteri yang tinggi dari ekstrak daun *S. crispus* karena adanya beberapa senyawa kimia dalam ekstrak daun ini, seperti polifenol, catechin, kafein, alkaloid, tanin, β -sitosterol, dan stigmaste. Penelitian lain mengenai uji toksisitas daun kejibeling sudah pernah diteliti dengan menunjukkan pertumbuhan normal dan sehat tanpa tanda-tanda toksisitas pada hewan coba (Nurraihana, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek ekstrak daun kejibeling terhadap peningkatan aktifitas fagositosis makrofag dan produksi ROI makrofag pada mencit putih Strain *Swiss* yang diinfeksi bakteri *S.aureus*, sehingga diharapkan dapat menjadi landasan untuk bekal penelitian lebih lanjut pada manusia.

Metode

Tiga puluh mencit putih galur *swiss* (jenis kelamin jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-30 gram) dibagi secara acak dalam empat kelompok masing-masing 6 ekor. Kelompok kontrol (K), hanya diberi pakan dan minum standar. Pada kelompok perlakuan (P1,P2,P3), mencit diinfeksi bakteri *S.aureus* kemudian diberi ekstrak daun kejibeling dengan dosis bertingkat 150; 300; 600 mg/kg BB. Dosis berdasar penelitian sebelumnya yang digunakan untuk mengukur toksisitas ekstrak

Tabel 1. Persentase dan rerata makrofag

Kelompok	N	Persentase makrofag memfagositosis latex		Rerata latex yang difagositosis makrofag		Persentase makrofag yang mensekresi ROI		Rerata skor ROI makrofag		p
		Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	
K+	6	40,00	36-44	1,93	1,5-2,4	36,33	29-40	55,50	45-63	0,001
P1	6	62,33	59-67	5,23	4,6-5,8	64,50	60-67	99,33	94-105	
P2	6	60,50	55-65	4,67	4,0-5,3	57,33	52-62	91,50	83-98	
P3	6	59,67	56-63	4,43	3,8-4,8	56,17	51-60	87,33	80-94	

Sumber : Data Primer

Tabel 2. Perbedaan pada tiap kelompok

	makrofag yang memfagositosis latex			latex yang difagositosis makrofag			Makrofag yang mensekresi ROI			Rerata skor ROI makrofag		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
K+	0,001 ^a	0,001 ^b	0,001 ^c	0,001 ^a	0,001 ^b	0,001 ^c	0,001 ^a	0,001 ^b	0,001 ^c	0,004 ^a	0,004 ^b	0,004 ^c
P1	-	0,317 [*]	0,150 [*]	-	0,015 ^d	0,001 ^e	-	0,002 ^d	0,001 ^e	-	0,045 ^d	0,005 ^e
P2	-	-	0,646 [*]	-	-	0,294 [*]	-	-	0,573 [*]	-	-	0,170 [*]

Sumber :Data Primer

- ^a. Terdapat perbedaan signifikan K+ dengan P1
- ^b. Terdapat perbedaan bermakna K+ dengan P2
- ^c. Terdapat perbedaan bermakna K+ dengan P3
- ^d. Terdapat perbedaan bermakna P1 dengan P2
- ^e. Terdapat perbedaan bermakna P1 dengan P3
- * Tidak terdapat perbedaan bermakna

daun kejibeling.¹⁰ Pemberian ekstrak daun kejibeling dilakukan selama delapan hari dan injeksi bakteri *S.aureus* dilakukan pada hari pertama dengan konsentrasi 10⁸ cfu sebanyak 0,2 mL *intraperitoneal*.

Kemampuan fagositosis non spesifik dilakukan *in vitro* dengan menggunakan *latex beads*. *Latex beads* diresuspensikan sehingga mendapat konsentrasi 2,5 x 10⁷/ml. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2 kali, kemudian ditambahkan suspensi lateks 200 µl/sumuran dan diinkubasikan selama 60 menit pada 37°C, CO₂ 5%. Sel dicuci 3x dengan PBS (untuk menghilangkan partikel yang tidak difagositosis). Aktivitas fagositosis makrofag dinilai dari persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex, dihitung dari 100 makrofag yang terlihat di bawah mikroskop cahaya, dan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh setiap makrofag. Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh setiap makrofag dihitung dengan cara membagi jumlah partikel latex yang difagositosis dengan jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex (Tjahajati, 2005).

Suspensi makrofag yang telah dihitung

dan dikultur pada *microplate* 12 well yang telah diberi *coverslip* bulat, setiap sumuran 200 µL (5 x 10⁵ sel), diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 60 menit. Memasukkan 500 µl larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja, diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 60 menit. Sel dicuci dengan PBS 3x lalu dikeringkan pada suhu kamar. Sel dicuci dengan PBS 3x lalu dikeringkan pada suhu kamar, fiksasi dengan methanol absolut selama 2 – 3 menit. Aktivitas makrofag untuk memproduksi ROI diukur dengan menghitung persentase makrofag yang mensekresi ROI yaitu yang menunjukkan pembentukan formazan (warna gelap), dihitung 100 makrofag yang terlihat di bawah mikroskop cahaya, dan skor derajat pembentukan formazan oleh tiap 100 makrofag, dihitung dengan cara menjumlahkan besarnya skor yang dicapai oleh 100 makrofag. Skor 0 jika pada makrofag tidak terbentuk formazan, skor 1 jika pada makrofag terbentuk formazan tetapi tidak memenuhi seluruh sel, dan skor 2 jika formazan yang terbentuk memenuhi seluruh sel (Tjahajati, 2005). Untuk menganalisis perbedaan aktivitas fagositosis makrofag antar kelompok dilakukan

uji *Annova* dilanjutkan analisis *Post Hoc* dengan uji LDS. Dan untuk menganalisis produksi ROI makrofag dilakukan uji *Kruskal wallis* dilanjutkan analisis *Post Hoc* dengan uji *Mann whitney U*.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas fagositosis yang dinilai dari persentase makrofag yang memfagositosis latex, menunjukkan bahwa persentase fagositosis kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun kejobeling lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal yang serupa nampaknya juga terlihat pada pola hasil penghitungan rata-rata latex yang difagositosis oleh setiap makrofag. Hasil uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* menunjukkan semua data berdistribusi normal, selanjutnya dilakukan uji beda statistik parametrik *Annova* didapatkan perbedaan yang bermakna antar kelima kelompok ($p=0,001$). Selanjutnya dilakukan uji statistik *Post Hoc* LDS untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok, hasil dapat dilihat pada tabel 2.

Hasil *mean* persentase makrofag yang memfagositosis latex pada penelitian tertinggi pada kelompok perlakuan P1 dan yang terendah pada kelompok K+ dengan nilai uji *Annova* $p<0,05$ ($p=0,001$). Aktivitas fagositosis terendah didapat pada kelompok K+ 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 (Faroka, 2013). Pemberian ekstrak daun kejobeling pada kelompok P1 dengan dosis 150 mg/kgbb menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dengan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok lain. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa aktif dalam ekstrak daun kejobeling terutama tanin dan flavonoid. Hasil ini sejalan dengan penelitian mengenai ekstrak daun salam yang mengandung senyawa kimia flavonoid yang mampu meningkatkan fagositosis makrofag pada kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas pembunuhan terhadap bakteri juga meningkat (Lee, 2012).

Rata-rata latex yang difagositosis lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak daun kejobeling dibanding dengan kelompok

kontrol, dan puncak rata-rata tertinggi pada kelompok P1. Untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dilakukan uji statistik *Post Hoc* LDS (Tabel 2). Penurunan aktivitas fagositosis makrofag dengan perbedaan yang tidak signifikan tampak pada kelompok P2 dan kelompok P3, hal ini kemungkinan disebabkan oleh dua faktor. Faktor pertama, mungkin disebabkan oleh mekanisme ekstrak daun kejobeling 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 kedua, sistem imun memiliki mekanisme homeostasis yang menjaga agar tidak terjadi peningkatan respon imun yang berlebihan yang dapat menyerang jaringan tubuhnya sendiri (Lusiana, 2006).

Hasil kemampuan produksi ROI makrofag dinilai dari persentase makrofag yang mensekresi ROI, menunjukkan bahwa persentase makrofag yang mensekresi ROI kelompok mencit yang diberi ekstrak daun kejobeling lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari hasil tersebut juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun kejobeling dapat meningkatkan produksi ROI makrofag dalam usahanya untuk memusnahkan *S.aureus* yang masuk ke dalam tubuh mencit. Aktivitas fagositosis makrofag yang tinggi dapat diasumsikan bahwa makrofag yang mensekresi ROI juga akan tinggi (Tjahajati, 2005). Peningkatan produksi ROI makrofag pada mencit *swiss* dikarenakan karena kandungan zat aktifnya yang berkhasiat sebagai antimikroba dan meningkatkan sistem imun tubuh dengan menstimulasi sel-sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler. Hasil ini sejalan dengan penelitian mengenai teh hijau yang mengandung senyawa kimia tanin yang mampu meningkatkan produksi ROI makrofag (Taylerson, 2012). Dengan adanya senyawa zat aktif tersebut memungkinkan terjadi peningkatan produksi IL-12 yang akan menstimulasi sel NK, membantu diferensiasi Th menjadi Th1. Sel ini akan mensekresi IFN- γ yang berfungsi mengaktifasi makrofag untuk memproduksi oksigen reaktif yaitu ROI (*Reactive oxygen intermediate*) (Baratawidjaja, 2009).

Skor ROI yang disekresi oleh makrofag (*formazan* yang terbentuk) diperoleh lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak daun kejibeling dibanding dengan kelompok kontrol, dengan puncak tertinggi skor ROI pada kelompok P1. Diuji normalitasnya dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* distribusi data tidak normal ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji beda menggunakan uji statistik parametrik *kruskal wallis*. Pada tabel 1 didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelima kelompok tersebut dengan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$). Perbedaan masing-masing kelompok dilanjutkan dengan uji statistik *Mann Whitney* (Tabel 2)

Ada penurunan produksi ROI yaitu pada kelompok perlakuan P2 dan P3. Hal ini mungkin terjadi karena adanya mekanisme penghambatan dari NO dan pelindung dari katalase dan glutathion peroksidase untuk melindungi diri dari kerusakan oksidatif akibat produksi ROI. ROI merupakan komponen sangat reaktif dalam membunuh dan menghancurkan bakteri, apabila ROI diproduksi secara terus menerus akan mengakibatkan kerusakan jaringan tubuh yang lain, dengan kemungkinan adanya peningkatan NO akan menghambat efek sitotoksik dari ROI (Nathan, 2000). Hal ini yang menjadi penyebab terjadi penurunan produksi ROI pada kelompok perlakuan.

Penutup

Pemberian ekstrak daun kejibeling dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan produksi ROI makrofag pada mencit putih strain *Swiss* yang diinfeksi *S.aureus* dengan dosis efektif pada 300mg/kgBb. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut terhadap sitokin TNF- α , INF- γ serta NO pada mencit *swiss* yang diinfeksi *S.aureus* yang diberi ekstrak daun kejibeling untuk melengkapi pembuktian efektivitas dari ekstrak daun kejibeling.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM yang telah memberikan ijin dan fasilitas selama penelitian. Kepada Laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro yang

telah membantu menyediakan *S.aureus* ATCC 25923. Kepada MIPA Biologi Universitas Diponegoro atas identifikasi tanaman daun kejibeling. Kepada Laboratorium MIPA Kimia Universitas Diponegoro pembuatan ekstrak daun kejibeling.

Daftar Pustaka

- Baratawidjaja KG. 2009. *Imunologi Dasar*. Edisi 8. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas kedokteran Universitas Indonesia
- Christian, K., William, L. 2008. *Staphylococcus aureus* new evidence for intracellular persistence. *Trends in Microbiology*.17 (2): 59-65.
- Faroka, D. Rahayu, S.Rifai'i,M. 2013. Peran Senyawa Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap Eekspresi CD62L pada Limpa Mencit yang Diberi Paparan *Staphylococcus aureus*. *El-Hayah* 3 (2)
- Lee W HAR, Intan ISMAIL. Antioxidant activity, total phenolics and total flavonoid of *Syzgium polyanthum* (Wight) Walp leaves. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2 (2): 219-228
- Lusiana, B. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi Daun Dewa (*Gynura pseudochina*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit C₃H Yang Diinokulasi Sel Adekarsinoma Mamma. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
- Muskhazli M, et al. 2009. Antibacterial Activity of Methanolic Crude Extracts from Selected Plant Against *Bacillus cereus*. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci* 2009. 32 (2): 175 – 183
- Nathan C, Shiloh MU. 2000. Reactive Oxygen and Nitrogen Intermediates in the relationship between mammalian host and microbial pathogens. *PNAS* 97 (16); p8841-48
- Nugrahani S, S. 2012. Ekstrak Akar, Batang dan Daun Herbba Meniran Dalam Menurunkan Kadar Glukosa Darah. *KEMAS* 8(1): 51-59.
- Nurraihana, H. and Norfarizan-Hanoon, N. A. 2013. Phytochemistry, pharmacology and toxicology properties of *Strobilanthes crispus*. *International Food Research Journal* 20(5): 2045-2056
- Tjahajati, I. 2005. Vaksinasi BCG Meningkatkan Aktivitas Fagositosis dan Sekresi Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Pada Makrofag Peritoneum Kucing Yang Diinfeksi Dengan *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 21 (2)
- Taylorson. 2012. The Health Benefits of Tea Varieties From *Camellia sinensis*. *The Plymouth Student Scientist*, 5, (1): 304-31