

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Annona muricata* Linn. terhadap Peningkatan Jumlah B220 pada *Mus musculus*

Dewi Parlinaningrum^{*)}, Sri Widyarti^{**)}, Muhaimin Rifa'i^{**)}

^{*)} Mahasiswa S1 Biologi

^{**)} Laboratorium Struktur dan perkembangan Hewan, Program Studi S1 Biologi, Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

Korespondensi: Sri Widyarti swid@ub.ac.id

ABSTRAK

Imunomodulator merupakan bahan yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun. Daun sirsak (*Annona muricata*) mempunyai senyawa-senyawa aktif yang berperan sebagai agen imunomodulator, salah satunya flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun sirsak terhadap peningkatan jumlah sel B220 pada mencit. Daun sirsak diekstrak menggunakan metode maserasi dan mesin rotatori evaporator. Selanjutnya ekstrak daun sirsak diberikan pada 4 kelompok mencit secara oral dengan dosis 0, 25, 50, dan 100 mg/kg BB setiap hari selama 2 minggu. Setelah perlakuan, dilakukan dislokasi pada mencit, kemudian sel-sel limfositnya diisolasi dari *bone marrow* dan dilakukan perhitungan jumlah sel dengan *flowcytometry* dan *haemocytometer*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*A. muricata*) menunjukkan pengaruh signifikan terhadap peningkatan jumlah sel B220 sebesar 123 % dari 32.56×10^6 menjadi 72.7×10^6 pada dosis 50 mg/kg BB.

Kata kunci: ekstrak etanol, daun sirsak, sel B220

ABSTRACT

Imunomodulator is material that can restore the immune system imbalances. Leaves of soursop leaves (*Annona muricata*) has active compounds that act as immunomodulatory agents, such as flavonoids. The purpose of this research was to determine the influence of ethanol extract of soursop leaves against an increasing number of B220 cells. Soursop leaves extraction using maceration methods and machine rotatori evaporator. These extract was given to 4 groups of mice orally a dose of 0, 25, 50, and 100 mg/kg/BW each day for 2 weeks. After treatment, mice was sacrificed, lymphocytes cells of the organ bone marrow was isolated and performed the calculations the number of cells with flowcytometry and haemocytometer. The results showed that administering ethanol extracts of leaves of the soursop (*A. muricata*) show the real impact of the increasing number of B220 cells as much 123 % (from 32.56×10^6 cells become 72.7×10^6).

Keywords: extract ethanol, *A. muricata*, B220 cells

PENDAHULUAN

Imunomodulator merupakan suatu senyawa yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik. Pertahanan non spesifik terhadap antigen ini disebut paraimunitas dan zat bersangkutan disebut penginduksi paraimunitas. Induktor semacam ini biasanya tidak atau sedikit sekali kerja antigennya, bahkan sebagian bekerja sebagai mitogen yaitu menaikkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas. Sel target dari imunomodulator adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B, karena induktor paraimunitas ini terutama menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. [1].

Daun sirsak (*A. muricata*) mempunyai kandungan senyawa antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, steroid/triterpenoid dan asetogenin. Penelitian membuktikan bahwa secara laboratoris senyawa flavonoid dapat meningkatkan produksi IL-2 dan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit sel T, sel B dan sel NK [2].

Penelitian ini menggunakan B220 yang hanya diekspresikan pada sel B dan subset dari sel-sel *bone marrow* yang termasuk precursor sel B. Antigen B220 merupakan satu bentuk dari bentuk molekuler CD45[3]. Antigen mencit CD45R (B220) mengekspresikan limfosit B yang seluruhnya berkembang dari fase pertama pro-B dan sampai *down-regulated* akhir diferensiasi sel plasma.

Terlepas dari sel B, CD45R mengekspresikan subset kecil sel denitrik[4].

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat terkait manfaat kandungan daun sirsak dalam memberikan pengaruh terhadap sistem imun, dan memberikan informasi kepada masyarakat terkait dosis daun sirsak yang tepat jika digunakan sebagai obat sehingga dapat dijadikan acuan penelitian selanjutnya

METODE PENELITIAN

Tempat penelitian. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Hewan coba. Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) galur SWISS, betina, umur 8 minggu dalam keadaan sehat (bergerak aktif, bulu tidak rontok), tidak ada kelainan anatomis. Hewan coba aklimatisasi selama 1 minggu.

Ekstraksi daun sirsak. Sirsak diperoleh dari perumahan Bantaran Kota Malang, Jawa Timur. Daun sirsak diekstraksi menggunakan metode maserasi dalam etanol 95% sebagai berikut. Daun sirsak dihaluskan dimasukkan ke dalam beker glass dengan etanol 95% perbandingan (1:3). Direndam dan didiamkan pada suhu kamar selama 3 x 24 jam dengan sesekali diaduk. Disaring dengan kertas saring Whatman No. 40 dan pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) dievaporasi/diuapkan dengan rotatori evaporator pada suhu 50-60 °C. Sisa pelarut yang masih tersisa dioven hingga bahan benar-benar tidak mengandung pelarut. Ekstrak ethanol yang didapatkan dilarutkan dengan NaCMC 0.5 %.

Perlakuan. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan: kelompok I (25 mg/kg BB), kelompok II (50 mg/kg BB), kelompok III (100 mg/kg BB) dan kelompok kontrol (NaCMC 0.5 %). Sediaan ekstrak diberikan secara oral setiap hari selama 14 hari.

Isolasi limfosit. *Bone marrow* diambil dari kaki bagian depan dan kaki bagian belakang, kemudian dicuci dalam PBS steril dan dibersihkan dari kulit, daging dan lemak yang menempel. Isolasi limfosit *bone marrow*

dilakukan dengan metode aspirasi. Suspensi sel ditambahkan PBS steril hingga 5 ml, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada 4 °C. Pellet yang diperoleh disuspensikan dengan 1 ml PBS, diambil 200 µL kembali dimasukkan dalam microtube yang sudah berisi 1 ml PBS, disentrifugasi kecepatan 2500 rpm selama 5 menit 4°C.

Penghitungan sel. Pellet diresuspensikan dengan 1 ml PBS steril. Homogenat sebanyak 100µl diambil dan dimasukkan dalam *microtube* baru. Disentrifugasi kembali pada kecepatan 2500 rpm 4°C selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Pellet kemudian diinkubasi dengan antibodi anti B220⁺ *antimouse*. Selanjutnya dimasukkan dalam kuvet *flowcytometer* dan ditambahkan 400µl PBS steril. Kuvet dipasang pada *nozzle BD FACS Calibur™ flow cytometer*. Jumlah absolut sel diperoleh melalui hasil perhitungan *flowcytometry* dan hasil perhitungan *haemocytometry* (1). R1 nilai persentasi *gated* kecil (*flow cytometry*), R2 nilai persentase *gated* besar (*flow cytometry*), Σ sel organ limfoid perhitungan sel pada organ limfoid menggunakan *haemocytometer*

$$\Sigma \text{ Absolut Sel} = (R1/R2 \times 100\%) \times (\Sigma \text{ sel organ limfoid}) \times (\%R1)$$

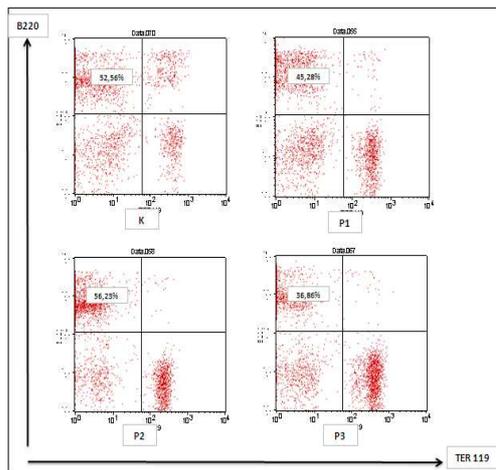
Analisis data. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji ANOVA selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perhitungan jumlah relatif sel B220 dengan *flowcytometer* menunjukkan terjadi penurunan pada mencit dengan perlakuan 25 dan 100 mg/kg BB. Namun pada perlakuan dosis 50 mg/kg BB, jumlah sel B220 mengalami kenaikan (Gambar 1).

Jumlah relatif. Sel B220⁺ pada mencit kontrol sebesar 52.345%, pada mencit yang diberikan perlakuan dosis 25 mg/kg BB cenderung terjadi penurunan jumlah relatif sel B220 sebesar 9.3 % namun tidak signifikan ($p>0.05$) yakni menjadi 43.03 %. Penurunan jumlah relatif sel B220 juga terjadi pada perlakuan dosis 100 mg/kg BB sebesar 13.6 % secara signifikan ($p<0.05$) menjadi 38.7 %. Hal berbeda terjadi pada perlakuan dosis 50 mg/kg BB yang cenderung mengalami kenaikan jumlah relatif sel B220⁺ sebesar 4.7 % namun tidak signifikan ($p>0.05$) menjadi 57.04 %.

B220 hanya diekspresikan pada sel B dan subset dari sel-sel *bone marrow* yang termasuk precursor sel B. Antigen B220 merupakan satu bentuk dari bentuk molekuler CD45[3]. Antigen mencit CD45R (B220) mengekspresikan limfosit B yang seluruhnya berkembang dari fase pertama pro-B dan sampai *down-regulated* akhir diferensiasi sel plasma. Terlepas dari sel B, CD45R mengekspresikan subset kecil sel dendritik[4].



Gambar 1. Persentase Jumlah Relatif Sel B220⁺ hasil analisa *Flowcytometry* Pada masing-masing perlakuan (K= Kontrol, P=perlakuan)

Penelitian lain membuktikan bahwa secara laboratoris senyawa flavonoid dapat meningkatkan produksi IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit T yang dirangsang oleh antigen, terutama diatur oleh pengaruh IL-2 terhadap reseptor IL-2 yang dimiliki pada permukaan selnya. Selain itu, IL-2 juga merangsang proliferasi dan diferensiasi sel B dan NK[2]. Penambahan bahan yang bersifat imunostimulator dapat meningkatkan respon pada limfosit dan merangsang pembelahan sel sehingga terjadi proliferasi [1]. Flavonoid memiliki efek imunostimulan dengan memacu produksi IL-2 yang meningkatkan proliferasi [5].

B220 atau CD45R adalah antigen yang diekspresikan oleh sel B, subset sel T (sel *naive*) dan monosit yang berfungsi sebagai isoform pada CD45 yang mengandung ekson A. Pada mencit, seluruh sel yang pada jalur perkembangan sel B akan mengekspresikan molekul permukaan CD45R, baik pada sel progenitor, sel pro-B pada sumsum tulang

belakang hingga sel B *mature* pada sirkulasi perifer dan sel B teraktivasi [6].

Flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4, kemudian sel Th1 teraktivasi. Flavonoid juga dimungkinkan dapat memicu proliferasi dan diferensiasi sel T dan sel B yang diduga melalui produksi sitokin IL-2, IL-4, dan IL-1[7]. Flavonoid jenis flavonol dapat menjadi imunostimulan yang dapat memacu peningkatan IL-2.[8].

Ekstrak daun sirsak mampu memberikan pengaruh juga terhadap jumlah sel T CD4 dan sel T CD8, tidak jauh berbeda pada pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap sel B220 yakni ada yang mampu meningkatkan jumlah sel dan mampu menurunkan jumlah sel tersebut jika dibandingkan dengan kontrol, Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mampu mempengaruhi produksi sel limfosit, baik sel T maupun sel B[10].

Senyawa flavonol glikosida adalah glikoprotein dari tumbuhan yang dapat bersifat sebagai mitogen yang mampu menginduksi mitosis pada sel-sel timus sehingga meningkatkan transkripsi (IFN- γ) dan (TGF- β) sehingga terjadi peningkatan sitokin-sitokin dan IL-2 dapat dirangsang dengan adanya faktor costimulator atau mitogen. Sel yang terpapar mitogen akan menstimulasi transkripsi mRNA IL-2 dalam waktu 4 jam dan maksimal 12 jam, kemudian pembentukan IL-2 dimulai dan sel berproliferasi [9].

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dosis 25, 50, dan 100 mg/kg BB belum menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel B220 secara efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Widiyanto, M. 2011. Imunomodulator. www.scribd.com/doc/92831441/ft-immunomodulator. Diakses tanggal 15 Juni, 2012.
- [2] Saifulhaq, M. 2009. Pengaruh pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa Dosis Bertingkat Terhadap Proliferasi Limfosit Lien pada Mencit BALB/C. *Biomedika* 1.2.33
- [3] Cell Science. 2012. B220. <http://www.copewithcytokines.de/>. Diakses tanggal 27 Juni, 2012.

- [4] Biotec, M. 2012. CD45R (B220) Antibodies Mouse. www.milterylobiotec.com. Diakses tanggal 20 Juni, 2012
- [5] Middleton, E., Kandaswami C., dan Theoharides T.C. 2000. The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52 (4):673-751
- [6] Abbas A.K. 2005. Immunity to tumours In *Cellular and Molecular Immunology*. WB Saunders Co. ed. 5th edition. Philadelphia.
- [7] Azizah, N.F. 2011. Efek Pemberian Tappak Liman terhadap Hematopoeisis Mencit model Anemia. Thesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- [8] Lyu, S.Y. dan Park, W.B. 2005. Production of Cytokine and NO by RAW 264.7 Macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. *Arch. Pharm. Res.* 28: 573-581
- [9] Peters, B., Schneider-Stock R, Boltze C, Jäger V, Epplen J, Landt O, Rys J, dan Roessner A. 2003. Elevated telomerase activity, c-MYC-, and hTERT mRNA expression: association with tumour progression in malignant lipomatous tumours. *J Pathol*, 199:517-525.
- [10] Dewi. L.K. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4 dan CD8 pada Mencit (*Mus musculus*). *Biotropica*. Vol 1. No.1.