

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Juni 2008

Penulis

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Ima Arum Lestarini
NIM Magister Biomedik : G4A005029
Tempat / Tanggal Lahir : Pemalang, 9 September 1974
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. Lulus SDN Perumnas Banyumanik IX Semarang Tahun 1986
2. Lulus SMP Negeri 21 Semarang Tahun 1989
3. Lulus SMA Negeri 4 Semarang Tahun 1992
4. Lulus Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Tahun 1998
5. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik UNDIP Semarang
6. PPDS I Patologi Klinik Universitas Diponegoro Semarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tenaga Dokter di RSPAD Gatot Soebroto Jakarta (1999-2000)
2. Dokter PTT Puskesmas Semowo Kabupaten Semarang (2001-2003)
3. Staf pengajar FK Universitas Mataram (2003 – sekarang)

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua : Ayah : Imam Soeprapto
Ibu : Sri Amini
2. Nama Suami : M. Dhike Firdausy, S.Sos
3. Nama Anak : 1. M. Sultan Ardhi Pratama Firdausy
2. Diajeng Aesya Mutiara Firdausy

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas anugerah dan kemurahannya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul ‘Pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* terhadap respon imunitas seluler mencit balb/c yang diinfeksi dengan *salmonella typhimurium*’. Tesis ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Magister di Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Demam tifoid adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri gram negatif intraseluler yaitu *S typhii* dan masih menjadi problem di negara kita. Pengobatan yang tidak rasional dan timbulnya *multi drug resistance* menyebabkan perlunya dikembangkan terapi yang dapat meningkatkan respon imun tubuh. *Phyllanthus niruri L* atau meniran merupakan tanaman tradisional yang banyak tumbuh di negara kita. Penelitian tentang manfaat meniran telah banyak dilakukan, namun demikian penelitian untuk melihat pengaruh dari pemberian *Phyllanthus niruri L* untuk respon imun seluler yang banyak berperan dalam pertahanan tubuh melawan infeksi terutama yang bersifat intraseluler seperti *S typhii* inilah yang membuat penulis melakukan penelitian ini untuk tesis.

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada dr. Purwanto AP, SpPK(K) selaku pembimbing utama dan juga selaku Ketua Program Studi PPDS1 Patologi Klinik, serta DR. Dra Henna Rya S, MES, Apt selaku pembimbing kedua atas segala bimbingan, dukungan dan semangat yang telah diberikan untuk mengerjakan dan menyelesaikan penelitian ini. Kami menyampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya atas bimbingan sekaligus sebagai guru kami yang dengan sabar dan bijaksana telah meluangkan waktu membantu dan mengarahkan demi terselesainya

program pendidikan kami. Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, MS.Med, Sp.And, Rektor Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik.
2. Prof. drs. Y. Warella, M.PA, PhD, Direktur Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik
3. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA (K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik.
4. dr. Soejoto, PAK, SpKK (K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik.
5. dr. Budi Riyanto, Msc, SpPD, KPTI, Direktur RS Dr. Kariadi atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik.
6. Prof. dr. Lisyani B Suromo, SpPK (K), Ketua Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang yang telah membimbing dan membantu kami selama pendidikan ini.
7. Seluruh staf pengajar PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP, para guru kami : dr. MI. Tjahjati, SpPK; dr. Imam Budiwiyo, SpPK (K); dr. Banundari RH, SpPK (K); dr. Herniah AW, SpPK; dr. Indranila KS, SpPK; dr. Ria Triwardhani, SpPK; dr. Nyoman Suci, MKes, SpPK yang telah membimbing dan membantu kami selama pendidikan ini.

8. Seluruh tim penguji, Prof. dr. Lisyani B Suromo, SpPK (K); Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA (K) FIAC; Prof. Dr. Edy Dharmana, PhD, SpParK; dr. Neni Susilaningsih, M.Si; dr. Noor Wijayahadi, M.Kes, PhD; drg. Henry Setyawan, MSc; dr. Dwi Pujonarko, M.Kes,SpS, yang telah berkenan memberikan masukan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
9. Prof. Sismindari, Apt., SU, PhD, Kepala Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM Yogyakarta beserta staf yang telah memberikan izin dan fasilitas serta pendampingan saat kami menjalankan penelitian sampai selesai.
10. Dra. Mulyati S, M.Si, Kepala Bidang Layanan Penelitian Pra-Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan (LP3HP) UGM Yogyakarta beserta staf yang telah memberikan fasilitas dan pendampingan dalam pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dengan baik hingga penelitian selesai.
11. Ibunda tercinta yang dengan tulus dan tiada henti memanjatkan doa dan restu serta dukungannya untuk keberhasilan kami.
12. Suamiku M. Dhike Firdausy, S.sos, Sultan dan Diajeng anakku tercinta atas pengertian dan pengorbanan, dukungan serta doa tulusnya hingga kami mampu bertahan dan menyelesaikan studi ini.
13. Adikku Rulie Kurniawan dan Widhie Estiningtyas yang dengan tulus dan tiada henti memanjatkan doa dan restu serta pengorbanannya.
14. Teman sejawat Residen Patologi Klinik : dr. Prima ; dr. Juwairiyah ; dr. Danis, terimakasih atas semangatnya; dr. Yekti ; dr. Tjhi Megawati ; dr. Agus ; dr. Rachmania ; dr. Andreas ; dr. Birhasani ; dr. Widiastuti ; dr. Kristiawan ; dr. Muji ; dr. Benny ; dr. Inda, dr. Rini, dr. Meita, dr. Emma, dr.Laily yang selalu memberi bantuan, dukungan dan semangat selama pendidikan ini.
15. Para Sejawat Alumni Patologi Klinik FK UNDIP : dr. Suryani Trismiasih, SpPK ; dr. Junaedi Wibawa, SpPK ; dr. Wahyu Siswandari, SpPK; dr. Indrayani

Padmosoedarso, SpPK; dr. Edy Purwanto, SpPK serta dr. Lily Vincencia, SpPK yang banyak mendukung dan mendoakan selama pendidikan ini.

16. Rekan angkatan 92 FK UNDIP : dr. Irsam, SpOG; dr. Hidayat ; dr. Dian; dr. Emmy; dr. Ira terimakasih atas segala bantuan, dukungan, semangat dan doanya.
17. Seluruh staf laboratorium Patologi Klinik dan Mikrobiolaogi RS Dr. Kariadi yang telah banyak membantu, membimbing dan bekerja sama selama kami menempuh program pendidikan ini.
18. Semua pihak yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu, yang turut membantu dan mendukung pendidikan kami selama ini.

Akhirnya kami menyadari bahwa karya akhir ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu sumbang saran dan kritik dari para guru serta pembaca lainnya akan kami terima dengan senang hati demi perbaikan di masa mendatang. Penulis berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat dan memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu. Tak lupa kami memohon maaf yang sebesar-besarnya apabila selama menempuh pendidikan maupun dalam pergaulan sehari-hari ada hal-hal yang kurang berkenan. Semoga Allah swt melimpahkan berkat dan kemurahanNya kepada kita semua. Amin.

Semarang, Juni 2008

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	4
1.3. Tujuan penelitian	5
1.4. Manfaat penelitian	6
1.5. Orisinalitas penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Salmonella	9
2.1.1 Morfologi dan identifikasi Salmonella typhii	9
2.1.2 Antigen dan virulensi salmonella	11
2.2. Patogenesis dan respon imun terhadap Salmonella	13
2.3. Peran Phyllanthus niruri L sebagai imunomodulator	19
2.4. Kerangka teori	25

2.6.	Kerangka konsep	26
2.7.	Hipotesis	26
2.8.	Keterbatasan penelitian	27
BAB 3	METODE PENELITIAN	
3.1.	Ruang lingkup penelitian	28
3.2.	Tempat dan waktu penelitian	28
3.3.	Jenis dan rancangan penelitian	28
3.4.	Populasi penelitian	30
3.5.	Sampel	31
3.5.1	Jumlah sampel	31
3.5.2	Cara pengambilan sampel	31
3.6.	Variabel penelitian	31
3.7.	Definisi operasional	31
3.8.	Alat dan bahan penelitian	32
3.8.1	Alat / Instrumen penelitian	32
3.8.2	Bahan dan reagen penelitian	33
3.9.	Prosedur pengumpulan data	33
3.10.	Alur penelitian	35
3.11.	Prosedur pemeriksaan	36
3.11.1.	Prosedur pemeriksaan jumlah leukosit	36
3.11.2.	Prosedur pemeriksaan hitung jenis dan gambaran morfologi limfosit	36
3.11.3.	Prosedur pemeriksaan produksi NO	37
3.11.4.	Prosedur pemeriksaan fagositosis makrofag dengan latex bead	38
3.12.	Analisis data	40
BAB 4	HASIL PENELITIAN	42
4.1	Jumlah Leukosit	42

4.2	Prosentase limfosit	44
4.3	Gambaran morfologi limfosit teraktivasi	45
4.4	Produksi nitrit oksida	48
4.5	Kemampuan fagositosis makrofag	51
BAB 5	PEMBAHASAN	55
5.1	Jumlah Leukosit	55
5.2	Prosentase limfosit	57
5.3	Gambaran morfologi limfosit teraktivasi	58
5.4	Produksi nitrit oksida makrofag	59
5.5	Kemampuan fagositosis makrofag	60
BAB 6	SIMPULAN DAN SARAN	62
6.1	Simpulan	62
6.2	Saran	63
	DAFTAR PUSTAKA	64
	LAMPIRAN-LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

- GAMBAR 1. *Salmonella sp*
- GAMBAR 2. *Salmonella typhii*
- GAMBAR 3. Bagian LPS pada *Salmonella*
- GAMBAR 4. Respon imun pada mukosa gastrointestinal
- GAMBAR 5. Pembentukan antibodi terhadap infeksi *Salmonella*
- GAMBAR 6. *Phyllanthus niruri* Linn
- GAMBAR 7. Grafik *error bar* jumlah leukosit
- GAMBAR 8. Grafik *error bar* prosentase limfosit
- GAMBAR 9. Grafik *error bar* limfosit teraktivasi
- GAMBAR 10. Grafik *error bar* produksi NO makrofag
- GAMBAR 11. Grafik *error bar* indeks fagositosis

DAFTAR TABEL

- TABEL 1. Hasil analisis deskriptif jumlah leukosit
- TABEL 2. Hasil analisis deskriptif prosentase limfosit
- TABEL 3. Hasil analisis deskriptif limfosit teraktivasi
- TABEL 4. Hasil uji *post hoc* Bonfferoni limfosit teraktivasi
- TABEL 5. Hasil analisis deskriptif produksi NO
- TABEL 6. Hasil uji *post hoc* Bonfferoni produksi NO makrofag
- TABEL 7. Hasil analisis deskriptif indeks fagositosis
- TABEL 8. Hasil uji *post hoc* Bonfferoni indeks fagositosis

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. *Ethical Clearance*
- Lampiran 2. Surat keterangan ijin melakukan penelitian
- Lampiran 3. Surat keterangan selesai melakukan penelitian
- Lampiran 4. SPSS Hasil Penelitian
- Lampiran 5. Foto – foto penelitian
- Lampiran 6. Foto – foto hasil pemeriksaan limfosit teraktivasi
- Lampiran 7. Kurva standar pemeriksaan NO makrofag
- Lampiran 8. Foto hasil pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag
- Lampiran 9. Prosedur pembuatan ekstrak *Phyllanthus niruri L*

ABSTRAK

Latar Belakang : Demam tifoid merupakan penyakit yang masih menjadi masalah di negara berkembang. *Phyllanthus niruri L* (meniran) merupakan tanaman tradisional mempunyai manfaat sebagai imunomodulator pada penyakit yang membutuhkan pertahanan sistem imun seluler maupun humoral. Pemberian ekstrak meniran dapat meningkatkan respon imun seluler pada infeksi bakteri intraseluler (*S.typhimurium*).

Tujuan : Membuktikan adanya pengaruh pemberian pemberian *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap respon imunitas seluler pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.

Desain dan Metoda : Penelitian eksperimental laboratorium menggunakan rancangan *the post test-only control group*. Mencit Balb/C jantan 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok yaitu P1 (diinfeksi *S.typhimurium* dan ekstrak PnL 125 µg), P2 (diinfeksi *S.typhimurium* dan ekstrak PnL 250 µg), P3 (diinfeksi *S.typhimurium* dan ekstrak PnL 500 µg), K1 (diinfeksi *S.typhimurium*) dan K2 (sehat). Uji beda menggunakan uji parametrik *one way ANOVA* dilanjutkan *post hoc test LSD*.

Hasil : *Phyllanthus niruri L* meningkatkan jumlah limfosit teraktivasi dan kemampuan fagositosis makrofag secara bermakna ($p=0,003$ dan $p=0,001$), dengan uji *post hoc* Bonferroni tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan (perbedaan dosis). Tidak ada perbedaan yang bermakna pada jumlah leukosit, hitung jenis limfosit dan produksi NO pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Simpulan: Pemberian *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan jumlah limfosit teraktivasi dan indeks fagositosis namun tidak sejalan dengan peningkatan dosis.

Saran : Penelitian lanjut tentang pengaruh *Phyllanthus niruri L* dibandingkan antibiotika kombinasi dengan *Phyllanthus niruri L*.

Kata Kunci : *Phyllanthus niruri L*, leukosit, prosentase limfosit, limfosit teraktivasi, nitrit oksida dan kemampuan fagositosis makrofag

ABSTRACT

Background: Typhoid fever is a problem in developing country. *Phyllanthus niruri L* (meniran) is a traditional plant that can be used as immunomodulator on cellular or humoral immunity. Giving *Phyllanthus niruri L* extract can increase cellular immunity responses in intracellular bacteri infection (*S.typhimurium*).

Aims: to proof of the effects of *Phyllanthus niruri L* on cellular immunity balb/c infected by salmonella typhimurium

Design and Method: This research was an experimental study using *the post test-only control group design*. Thirty male Balb/c mice were divided into five groups including P1 (infected by *S.typhimurium* and PnL extract 125 µg), P2 (infected by *S.typhimurium* and PnL extract 250 µg), P3 (infected by *S.typhimurium* and PnL extract 500 µg), K1 (infected by *S.typhimurium*) and K2 (healty mice). Parametric test of one way ANOVA and post hoc test LSD was applied.

Results : *Phyllanthus niruri L* increased number of activated lymphocytes and phagocyte abillity of macrophage (p=0,003 and p=0,001, respectively). Bonfferoni post hoc test resulted that no significantly difference between treatment groups(increased of dose). There were no significant difference in number of leukocyte, difference count of limphocyte and nitrit oxide produce among treatment groups and controls.

Conclusion: *Phyllanthus niruri L* dose 250 µg increased activated lymphocyte and index phagocytosis.

Suggestion: More studies are needed to find out the effects of *Phyllanthus niruri L* compare with combination of antibiotica and *Phyllanthus niruri L* .

Key words: *Phyllanthus niruri L*, leukocyte, procentage of lymphocyte, activated limphocyte, nitrit oxide and phagocyte abillity of macrophage

LAMPIRAN 1

ETHICAL CLEARANCE

LAMPIRAN 2

SURAT KETERANGAN IJIN MELAKUKAN PENELITIAN

LAMPIRAN 3

SURAT KETERANGAN SELESAI MELAKUKAN PENELITIAN

LAMPIRAN 4

SPSS HASIL PENELITIAN

LAMPIRAN 5

KURVA STANDAR TNF- α SERUM

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Demam tifoid merupakan penyakit endemik dengan gejala bervariasi mulai dari yang ringan seperti demam, malaise, dan batuk kering sampai rasa sakit pada abdomen dan berbagai komplikasi lainnya.¹ Penyebarannya terjadi secara oral – fekal,¹⁻³ oleh karena itu pada daerah dengan sanitasi rendah dan air bersih terbatas, penyakit ini mudah ditemui.³ Penyakit ini menyerang sekitar 22 juta orang per tahun dengan angka kematian mencapai 200.000 jiwa per tahun.³ Menurut WHO, pada tahun 2003 terdapat sekitar 900.000 kasus di Indonesia, di mana sekitar 20.000 penderitanya meninggal dunia.¹

Menurut WHO, di negara – negara maju antibiotika yang banyak digunakan sebagai pengobatan optimal adalah golongan fluoroquinolon. Golongan obat ini dapat ditoleransi baik oleh tubuh, diabsorpsi dengan baik secara oral, kerjanya lebih cepat dan efektif daripada obat sebelumnya (kloramfenikol).³ Di Indonesia sendiri kloramfenikol masih merupakan obat pilihan utama untuk mengobati demam tifoid.³⁻⁵ Akhir - akhir ini *Salmonella* strain *multidrug-resistant* (MDR) sering sekali dijumpai bahkan jumlahnya semakin meningkat pada beberapa tahun belakangan ini . Beberapa variasi dari *Salmonella* telah menghasilkan *multidrug-resistance* yang lebih berbahaya sebagai bagian integral dari material genetik organisme tersebut, sehingga dapat terus resisten bahkan setelah obat antibiotika tidak lagi digunakan.^{1,3} Pada

tahun 2002 diungkapkan bahwa secara umum penyakit infeksi selalu dihubungkan dengan gangguan sistem imunitas.⁶

Salmonella typhii merupakan bakteri gram negatif, fakultatif intraseluler yang dapat hidup bahkan berkembang biak dalam makrofag, tahan terhadap enzim-enzim lisosom, mempunyai kemampuan untuk mencegah fusi *phagosome-lysosome* sehingga sulit dibunuh, selain itu *Salmonella* mempunyai faktor virulensi utama yang berupa lipopolisakarida (LPS) yang dapat menstimulasi respons imun pada inang. Pada respons imun seluler melalui fagositosis oleh makrofag yang teraktivasi oleh sitokin IFN- γ yang diproduksi oleh sel T, kemudian IFN- γ akan memacu makrofag untuk membunuh melalui *respiratory burst*, dengan proses oksidatif yang memproduksi radikal bebas dan nitrit oksida dan aktivasi sel T CD8 yang akan melisis sel yang terinfeksi.⁷⁻⁹

Pada penelitian ini, infeksi *Salmonella typhimurium* digunakan sebagai model infeksi intraseluler yang dapat memacu imunitas seluler. Pada fase III hari ke 3-7 infeksi *Salmonella typhimurium*, terjadi pertumbuhan bakteri yang akan memacu makrofag memproduksi sitokinnya, sehingga akan mengaktivasi sistem imun baik alami maupun adaptif terutama sistem imun seluler.¹⁶ Infeksi intraseluler seperti infeksi virus dan kuman intrasel, pada gambaran darah tepi sering ditemukan sel limfosit yang teraktivasi.⁸

Phyllanthus niruri L (meniran) merupakan salah satu jenis imunostimulator yang dapat meningkatkan sistem imun pada binatang percobaan maupun manusia.^{10,11} Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi

beberapa komponen imunitas nonspesifik serta imunitas spesifik, baik humoral maupun selular. Efek terhadap respons imun nonspesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil¹², sitotoksitas sel NK serta aktivitas hemolisis komplemen⁶. Terhadap imunitas seluler, dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit T dengan meningkatkan sekresi TNF α , IFN γ dan IL-4, serta menurunkan sekresi IL-2 dan IL-10, sedangkan terhadap imunitas humoral, obat ini dapat meningkatkan produksi imunoglobulin M (IgM) dan IgG^{6,12-14}. Hal – hal tersebut di atas berperan dalam melawan infeksi, terutama untuk infeksi bakteri intraselular seperti *Salmonella typhi*.

Penggunaan *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator terus ditingkatkan. Keberadaannya diharapkan dapat mengurangi ketergantungan terhadap pemakaian antibiotik yang biasanya selalu diikuti dengan masalah resistensi^{2,15-18}. Selain itu *Phyllanthus niruri L* merupakan suatu imunomodulator alami dari jenis tanaman yang tumbuh baik di daerah tropis seperti Indonesia, sehingga hal tersebut sejalan dengan program pemerintah untuk mengembangkan dan meningkatkan kualitas obat-obat tradisional⁶. Dosis yang digunakan tergantung pada jenis sediaan dan kondisi dari pengobatan, untuk sediaan *tincture*, dosis rata-rata 0,2-3,0 mililiter 3 kali sehari dan untuk sediaan bubuk 250 mg - 1 gram sehari¹⁹ dan dosis untuk imunomodulator pada orang dewasa adalah 3 x 50 mg/hr.^{20,21}

Penelitian tentang manfaat *Phyllanthus niruri L*, khususnya untuk mencegah dan mengobati penyakit-penyakit infeksi terus di lakukan. Sejalan dengan hal tersebut peneliti ingin menguji manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* pada infeksi

Salmonella sebagai pendamping untuk meningkatkan imunitas seluler. Selain itu penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan utama di negara-negara berkembang, khususnya Indonesia.^{2,15,19,22,23} Sehubungan dengan hal-hal tersebut di atas, maka peneliti ingin mengetahui sejauh mana pengaruh *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan respons imun seluler pada infeksi *Salmonella typhimurium* pada dosis yang sesuai.

1.2. Rumusan masalah

Masalah utama yang mendasari penelitian ini adalah “Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* ?” Dari permasalahan tersebut dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- a) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari dengan yang tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap peningkatan jumlah leukosit pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.
- b) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari dengan yang tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap prosentase limfosit dalam sedimen apus darah tepi pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.

- c) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari dengan yang tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap gambaran morfologi limfosit dalam sedian apus darah tepi pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.
- d) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari dengan yang tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap produksi NO makrofag.
- e) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari dengan yang tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap kemampuan fagosit makrofag pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Membuktikan adanya perbedaan pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap respons imunitas seluler pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.

1.3.2. Tujuan khusus

Adapun tujuan khusus penelitian adalah sebagai berikut:

- a) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap peningkatan jumlah lekosit pada mencit

Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.

- b) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap prosentase limfosit dalam sediaan apus darah tepi pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.
- c) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap gambaran morfologi limfosit dalam sediaan apus darah tepi pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.
- d) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap produksi NO makrofag pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.
- e) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 µg selama 7 hari terhadap kemampuan fagositosis makrofag pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.

1.4. Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah tentang peran dan manfaat *Phyllanthus niruri L* sebagai tanaman yang mempunyai efek imunomodulator terhadap sistem imun tubuh dalam mengeliminasi patogen intraseluler terutama *Salmonella*. Karena penelitian ini bersifat eksperimental pada hewan coba, diharapkan hasilnya dapat memberikan informasi dan landasan bagi penelitian selanjutnya, terutama uji pre klinik dan klinik.

1.5 Orisinalitas penelitian

No	Tahun	Peneliti	Judul	Hasil
1	1992 AIDS-Res – Hum – retrovirus.1992 Nov; 8(11); 1937-44	Ogata, T., et al.	HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from <i>Phyllanthus niruri</i> .	Menghambat reverse transcriptase HIV-1 sampai 90% produksi pada antigen p24 pada H9 clone.
2	1996 Eur J Clin Invest 1996 Dec;26(12): 1069-76	Lee CD, Ott M, Thyagarajan SP, et al	<i>Phyllanthus amarus</i> down regulated Hepatitis B virus m- RNA transcription and replication	Menghambat aktivitas polymerase HBV, menurunkan episomal DNA HBV dan mensupresi release virus kultur
3	1996 J.Nat Prod.1996 Feb; 59(2):196-9	Qian- Cutrone, J.	Niruriside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from <i>Phyllanthus niruri</i> .	Menghambat aktivitas melawan ikatan Protein REV terhadap RRE RNA dengan nilai IC 50 3,3 microM.
4	1996 Int Coff AIDS 1996 Jul 7-12; 11:67	Mullen JE, O’Shea S., et al	Inhibition of HIV replication by the plant <i>Phyllanthus amarus</i>	<i>Phyllanthus amarus</i> dapat menghambat secara in vitro replikasi HIV oleh komposisi zat aktifnya.
5	2001 Journal of Viral	Liu, J., et al.	Genus <i>Phyllanthus</i> for chronic Hepatitis B virus infection: A systematic review.	n=1947, double blind trials, hasil menunjukkan <i>Phyllanthus sp</i>

	Hepatitis, 2001, 8:358-66			mempunyai efek positif pada klerens HBsAg serum (RR 5,64, 95% CI 1,85-17,21), kombinasi <i>Phyllanthus dan IFN</i> clearance HBeAg (1,56, 1,06-2,32), HBV DNA (1,52, 1,05-2,21)
6	2001	Xin-Hua, W., et al.	A comparative study of <i>Phyllanthus amarus</i> compound and interferon in the treatment of chronic viral Hepatitis B.	2 grup, 30 dengan PACo dan 25 dengan IFN alfa 1b selama 3 bulan, hasil nilai efektifitas dan serokonversi HBeAg dan HBV-DNA tidak menunjukkan nilai perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$; $p > 0.005$). Efek PACo pada perbaikan fx hati dan menghambat replikasi HBV
7	2001 Berkala Ilmu Kedokteran Vol. 33, No 2	Praseno dkk	Perbandingan efikasi infusa meniran (<i>Phyllanthus niruri L</i>) dan kotrimoksazol pada pengobatan infeksi kulit oleh <i>Staphylococcus aureus</i>	Waktu kesembuhan lebih cepat pada kelompok meniran daripada kelompok kontrol
8	2003 Elsevier Science	Kiemer, A. K., et al.	<i>Phyllanthus amarus</i> has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway.	<i>Phyllanthus amarus</i> menghambat induksi iNOS, COX-2 dan TNF- α
9	2003 Indian Journal of Medical Science, Vol 57, No 9,2003:387-93	Naik AD, Juvekar AR	Effect of alkaloidal extract of <i>Phyllanthus niruri</i> on HIV replication	Supresi aktivitas HIV-1 pada sel kultur pada sel MT-4 <i>cell lines</i> . Alkaloid pada ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> menghambat sitopatik respons pada sel yang diinduksi HIV.
10	2003 (Tesis)	Chodidjah	Pemberian ekstrak (<i>Phyllanthus niruri L</i>) pada sel mononuklear terhadap viabilitas sel adenokarsinoma mammae mencit C3H	Penurunan viabilitas sel tumor pada pemberian ekstrak <i>Phyllanthus niruri L</i>
11	2004	Notka, F., et al.	Concerted inhibitory activities of <i>Phyllanthus amarus</i> on HIV replication in vitro and ex vivo.	Memblok interaksi GP120 HIV-1 dengan sel reseptor CD4

12	2005	Radityawan D	Pengaruh <i>Phyllanthus niruri</i> sebagai imunomodulator terhadap kadar IFN- γ pada penderita tuberkulosis paru	Adanya pengaruh aktivitas IFN- γ
13	2007 (Tesis)	Sunarno	Efek <i>Phyllanthus niruri L</i> pada Prosentase Neutrofil, Koloni Bakteri Limpa dan Histopatologi Hepar Mencit Balb/C yang Diinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i>	manfaat <i>Phyllanthus niruri L</i> terhadap jumlah koloni kuman dan histopatologi hepar
14	2007	Penulis	Pengaruh pemberian <i>Phyllanthus niruri L</i> terhadap status imunologi mencit Balb/C yang diinfeksi dengan <i>Salmonella typhimurium</i>	

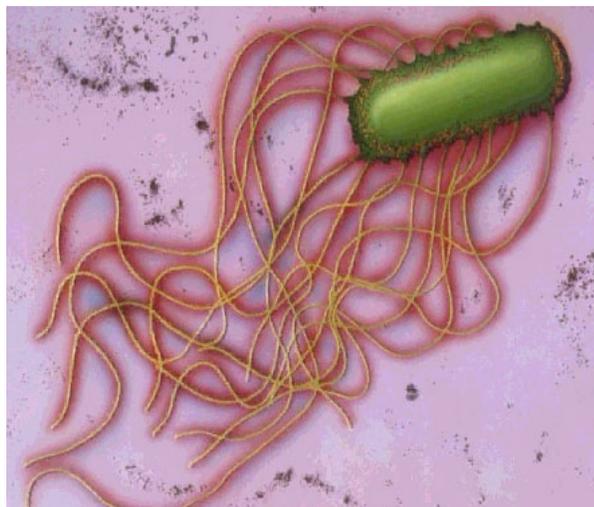
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Salmonella

2.1.1. Morfologi dan identifikasi *Salmonella thypii*

Salmonella sp. merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek dan termasuk dalam famili Enterobacteriaceae, genus *Salmonellae*.²⁴ *Salmonella* bersifat motil dengan *peritrichous flagella*. Mempunyai karakteristik memfermentasikan glukosa dan manosa tanpa memproduksi gas, tetapi tidak memproduksi laktosa. Sebagian besar *Salmonella* memproduksi gas H₂S. *Salmonella* tahan terhadap bahan kimia tertentu seperti *brilliant green*, sodium tetrathionat dan sodium dioksilat, yang menghambat bakteri lain sehingga senyawa tersebut sering ditambahkan pada media untuk mengkultur *Salmonella*.²⁴



Gambar 1. *Salmonella sp*²⁵



Gambar 2. *Salmonella typhi* setelah kultur 24 jam dalam agar Mac.Conkey (foto diambil dari laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP)

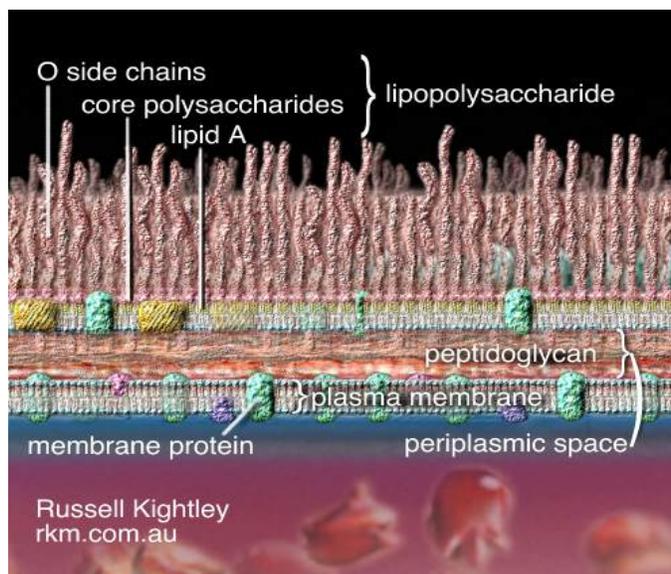
Beberapa jenis media telah direkomendasikan untuk mengisolasi *Salmonella*. Beberapa media bersifat diferensial dan non selektif, media tersebut mengandung laktosa dan pH indikator (*bromocresol purple lactose agar*). Media lain bersifat lebih diferensial dan selektif karena selain mengandung laktosa dan pH indikator juga mengandung zat – zat inhibitor terhadap bakteri non *Salmonella* (agar *MacConkey*, agar *eosin-methylene blue*). Media yang paling sering digunakan untuk mengisolasi *Salmonella* adalah agar *Salmonella Shigella (SS)*, agar *bismuth sulfite*, media *Hektoen enteric (HE)*, agar *brilliant green* dan agar *xylose-lisine-deoxycholate (XLD)* ²⁶

Ada lebih dari 2400 serotipe *Salmonella* yang pembagiannya berdasar atas epidemiologi, jenis inang, reaksi biokimia, dan struktur antigen O, H dan Vi.²⁴ Pada bakteri gram negatif dinding sel terdiri dari lapisan peptidoglikan dan membran luar yang terdiri dari lipoprotein dan lipopolisakarida (LPS) . LPS yang sangat toksin disebut endotoksin karena dia melekat erat pada permukaan sel dan hanya dikeluarkan jika sel mengalami lisis.²⁴

2.1.2. Antigen dan virulensi Salmonella

Salmonella merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang termasuk dalam familia Enterobacteriaceae, genus *Salmonellae*. Salmonella bersifat motil dan patogenik dengan karakteristik pertumbuhan menghasilkan fermentasi glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, negatif oksidase, positif katalase, tidak membentuk spora, dan fakultatif aerobik^{27,28}. Biasanya bakteri dikultur pada medium selektif seperti *Salmonella-Shigella Agar* untuk memisahkannya dari bakteri enterik lain²⁸.

Salmonella dibagi menjadi 3 serovar berdasarkan antigen utama yang dimiliki, yaitu O (*somatic*), Vi (*capsular/surface*) dan H (*flagellar*)^{2,28}. Membran sel tersusun atas kompleks molekul glikolipid yang dikenal dengan nama lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin.^{25,30,31} 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 enzim yang memproses antigen, yaitu dengan cara memperlambat pemrosesan dan menghambat aktivasi epitop tertentu. Hal ini juga dapat merintangi aktivasi sel T, khususnya CD4 karena pada umumnya mereka lebih mengenali epitop peptida daripada polisakarida.³¹⁻³³ Strain yang memiliki LPS lengkap juga resisten terhadap lisis komplemen melalui jalur *membrane attack complex (MAC)*^{29,30}



Gambar 3. Bagian dari LPS pada *Salmonella* ²⁵

Salmonella typhimurium dapat menyebabkan penyakit sistemik pada binatang yang menyerupai tifoid pada manusia sehingga lazim dipakai untuk meneliti patogenesis penyakit tersebut.^{31,34} Meskipun demikian, *Salmonella typhi* dan *paratyphi* sebagai agen penyebab typhoid mempunyai antigen Vi ^{2,25} yang tidak dipunyai oleh *Salmonella typhimurium*. Antigen Vi ini mampu mereduksi pengeluaran IL-8 yang berperan untuk menginduksi polimorfonuklear (neutrofil). Oleh karena itu, pada awal infeksi *Salmonella typhimurium*, sel radang yang mendominasi adalah sebulan sel polimorfonuklear, sedangkan pada infeksi *Salmonella typhi* dan *paratyphi* didominasi oleh sebulan sel mononuklear.³⁵⁻³⁷ *Salmonella* dapat bertahan hidup dalam makrofag yang memfagositnya dan mampu melakukan multiplikasi di dalam fagosom yang tidak berfusi.³⁸⁻⁴¹ Hambatan fusi fago-lisosom berhubungan dengan peningkatan survival intrasel dan virulensi bakteri, dimana *Salmonella* merespons lingkungan intrasel dengan meregulasi ekspresi protein tertentu.^{38,39,41-43} *Salmonella* juga bersifat toksik terhadap makrofag. Sitotoksitasnya ditandai dengan makropinositosis pada makrofag yang terinfeksi diikuti dengan kematian sel. Gambaran apoptosis berupa kondensasi dan fragmentasi kromatin, pembengkakan membran dan munculnya nukleosom sitoplastik²⁹.

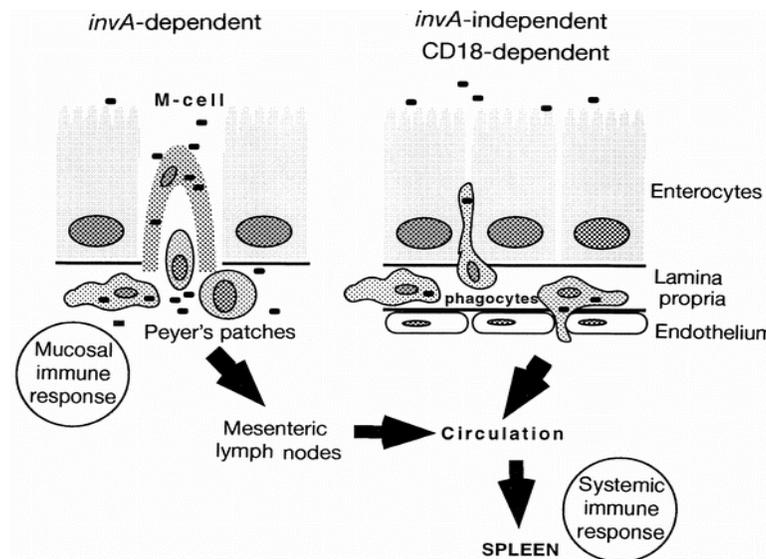
Salmonella juga mempunyai kemampuan bermultiplikasi dalam parenkhim sel non fagosit, seperti hepatosit dan epitel intestinal.⁴⁸ Di dalam sel, mikroba ini tinggal dalam vakuola yang berikatan dengan membran. Hal ini memungkinkannya terlindungi dari makrofag dan respons humoral. Antigen bakteri yang mencapai sitoplasma akan didegradasi dan menghasilkan fragmen peptida yang berikatan dengan MHC I untuk dipresentasikan ke CD8.^{29,44}

2.2. Patogenesis penyakit dan respons imun terhadap *Salmonella*

Salmonella patogenik mempunyai urutan gen invasif,^{38,39,41-43} menghasilkan protein yang disekresi oleh bagian khusus untuk menghancurkan epitel. *Salmonella*

yang masuk ke dalam saluran cerna akan menembus epitel illeosekal³⁷ dan bermultiplikasi dalam folikel limfoid intestinal¹⁶, kemudian mengikuti aliran limfe memasuki sirkulasi darah menuju organ RES terutama hepar dan limpa serta organ lain sehingga akan menyebabkan perubahan histopatologik organ-organ tersebut. Kemungkinan kedua adalah bakteri mencapai sirkulasi karena terbawa makrofag yang terinfeksi.^{34,29,30,45,46}

Salmonella memasuki epitel illeum dengan cara invaginasi pada mikrovili yang akan membesar dan menyatu bersamaan dengan masuknya bakteri tersebut melalui *brush border*. *Salmonella* dapat merusak permukaan penghubung yang menyatukan sel epitel dan melakukan penetrasi pada barrier epitel melalui radang interseluler. Pada plak peyeri terjadi pembengkakan berwarna merah muda di akhir minggu I, namun permukaan mukosa tetap utuh. Kelenjar limfe mesenterium juga membesar dan terdapat area nekrotik serta hemoragik. Pada akhir minggu III dasar ulkus meluas sampai lapisan otot, permukaan usus tertutup serosa dan bisa menjadi peritonitis fibrosa.⁴⁵⁻⁴⁹



Gambar 4. Respons imun pada mukosa gastrointestinal terhadap infeksi *Salmonella*. Bakteri akan melalui aliran darah ke limpa yang akan menghasilkan respons imun spesifik.⁵⁰

Sementara itu perubahan histopatologi hepar terjadi akibat dari endotoksin *Salmonella* dan reaksi imun melawan kuman sehingga timbul jejas pada sel hepatosit yang bersifat *reversible*. Dengan mikroskop cahaya di hepar akan terlihat gambaran degenerasi lemak disertai pembengkakan sel sebagai manifestasi pertama jejas akibat pergeseran air ekstra ke intrasel. Hepar mengalami hiperemia, lebih lunak dan membengkak serta dapat terjadi pembentukan abses. *Cloudy swelling* juga bisa terjadi pada minggu pertama infeksi. Terjadi degenerasi *ballooning* dengan vakuolisasi sel-sel hepatosit. Proliferasi sel kupffer, limfosit, dan neutrofil muncul diantara sel-sel hepatosit yang disertai pembentukan fokal *nodul typhoid*⁴⁵.

Infeksi *Salmonella* melibatkan limpa sehingga organ tersebut mengalami hiperplasia dan hipertropi, lunak dan membengkak akibat proliferasi limfosit di pulpa

merah serta infiltrasi neutrofil dan makrofag ke dalam limpa. Aktivasi limfosit limpa disebabkan oleh respons 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 bakteri⁴⁵.

Secara singkat perjalanan infeksi sistemik *Salmonella* dapat digambarkan dalam beberapa fase. Fase I terjadi sekitar 1 jam setelah diinfeksi secara intravena atau intraperitoneal. Lebih dari 90 % kuman yang diinokulasi ditangkap dan dirusak oleh fagosit residen. Fase II dimulai sejak hari I infeksi yang disebut tahap pertumbuhan eksponensial. Kuman masuk ke dalam sirkulasi melalui pembuluh limfe melakukan invasi ke hepar dan limpa untuk selanjutnya melakukan multiplikasi. Neutrofil sangat penting pada fase ini sebagai pertahanan *host* dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Fase III terjadi setelah 3-7 hari, pertumbuhan bakteri pesat di hati dan limpa serta menjadi pertumbuhan yang menetap. Makrofag yang teraktivasi memproduksi sitokin proinflamasi. Makrofag teraktivasi bukan untuk membunuh akan tetapi untuk meningkatkan killing sel NK dengan produksi sitokinnya. Fase pembersihan terjadi setelah minggu ketiga infeksi yang melibatkan imun adaptif khususnya sel T.^{16,28-30,51}

Respons imun terhadap salmonella meliputi sistem imun natural (*innate*) dan sistem imun adaptif (*acquired*).^{44,51} Sistem imun natural berfungsi untuk mengidentifikasi dan melawan mikroba serta penanda imun adaptif.¹⁷ Respons imun natural dimulai dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti

pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi host terhadap infeksi. Peran ini dilakukan oleh makrofag, sel NK, dan neutrofil.^{34,38,47} Adapun pengeluaran mediator inflamasi berfungsi untuk memperkuat respons imun²⁹.

Makrofag mensekresi IL-1, -6, -8, -12, -15, -18 dan TNF alfa^{31,38,51}. Interleukin -1, -6, dan TNF alfa bekerja sinergis untuk meningkatkan aktivasi sel T dan respons radang akut. Interleukin-8 membantu menarik neutrofil ke tempat infeksi^{32,36,42,48}. Interleukin -12 mengaktivasi sel NK dan memicu diferensiasi CD4 menjadi Th1. Interleukin -12 juga meningkatkan kemampuan bakterisidal fagosit, meningkatkan IFN γ , dan meningkatkan sintesis NO. Interleukin -15 penting untuk respons inflamasi, fungsi antimikrobal neutrofil, stimulasi CD8 serta perkembangan, *survival*, dan fungsi sel NK. Interleukin -18 menginduksi IFN γ , ko-aktivasi Th1, dan perkembangan sel NK^{39,40}. Makrofag juga mengeluarkan ROI dan RNI yang dapat meningkatkan mekanisme membunuh bakteri. Makrofag mampu menghancurkan bakteri dengan *respiratory burst* yang menghasilkan *reactive oxygen species (ROS)* seperti superoksida, hidrogen peroksidase dan NO.^{29,32,33,39}

Sel NK berperan sebagai sel sitotoksik atau sitolitik yang dapat menghancurkan sel yang terinfeksi. Sel NK juga memproduksi IFN γ , TNF alfa, dan *granulocyte macrophage colony stimulating factor (GMCSF)*. IFN γ meningkatkan sejumlah reseptor TNF alfa dan transkripsi mRNA. Sebaliknya TNF alfa dibutuhkan untuk produksi IFN γ . IFN γ meningkatkan respons CMI dengan mengaktivasi makrofag dan menginduksi diferensiasi sel Th menjadi Th1. Sel NK berperan sebagai

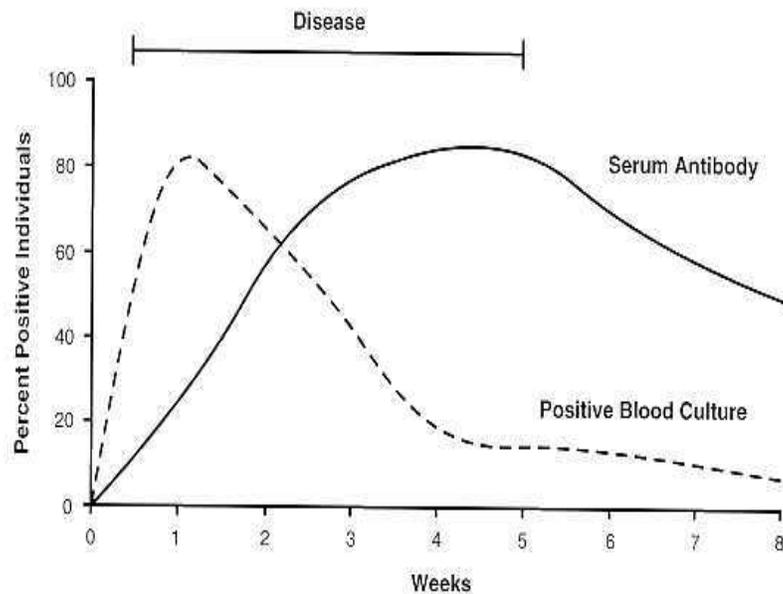
jembatan antara imunitas alami dan imunitas adaptif, memodulasi hematopoiesis, dan meningkatkan granulosit makrofag.^{17,29,32,51}

Neutrofil mampu menghasilkan *oxidative burst* seperti makrofag yang berkontribusi dalam membunuh bakteri. Nitrit oksida (NO) diproduksi bersama dengan L-sitrulin melalui oksidasi enzimatik dari L-arginin. Produksi NO distimulasi oleh IFN γ , TNF alfa, IL-1 dan IL-2. Nitrit oksida merupakan implikasi respons terhadap bakteri intraseluler seperti *Salmonella* yang tercermin dengan melimpahnya NO di bagian luar fagosom. Antara ROI dan NO dapat berinteraksi dengan membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik seperti peroksi-nitrit yang dapat meningkatkan daya bunuh makrofag terhadap *Salmonella*.^{29,32,33}

Sementara itu pada imun adaptif sel yang berperan adalah APC, sel T dan sel B.^{39,44,51,52} Sel dendritik merupakan APC yang penting dalam inisiasi respons imun yang diperantarai sel T dan bersama dengan makrofag mempresentasikan antigen yang diproses dari bakteri intrasel gram negatif seperti *Salmonella*.^{17,44,51}

Pada infeksi bakteri intraseluler dan virus pada sediaan apus darah tepi dapat terlihat limfosit atipik / teraktivasi dengan limfosit yang lebih besar dan reaktif, sitoplasma lebih lebar, warna lebih biru atau abu-abu, inti oval, bentuk ginjal atau *lobulated*, kadang kadang terdapat anak inti dan kromatin lebih kasar.⁸ Faktor yang berperan dalam perubahan sel Th adalah limfokin yang mengaktifkannya. Jika berupa IL-2 dan IFN γ , yang berkembang adalah Th1 dan akan menekan Th2. Sebaliknya jika IL-4 yang dikeluarkan, maka Th2 yang akan berkembang. Diferensiasi sel Th juga

dipengaruhi jenis APC, jika APC-nya makrofag (sumber IL-12), yang akan berkembang adalah Th1, tetapi jika APC-nya sel B, yang berkembang Th2.^{17,32,33,45,51}



Gambar 5. Pembentukan antibodi terhadap infeksi *Salmonella*.³¹

Sel T diperlukan untuk ekspresi penuh imunitas terhadap *Salmonella*.^{38,40,44}

Sel T dengan *Cluster designation 4* (CD4) berfungsi dalam membantu aktivasi dan diferensiasi sel B. Selain membantu sel B membentuk antibodi^{31,51}, juga 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 fagosit⁵³. Ketika distimulasi, CD4 akan memproduksi IL-2 yang dibutuhkan sel T untuk berkembang menjadi Th. Defisiensi CD4 menyebabkan terjadinya infeksi

kronis, sedangkan pada defisiensi sel B masih mampu mengontrol dan mengeliminasi infeksi *Salmonella*. Jadi dapat disimpulkan bahwa CD4 juga berperan untuk mengaktifasi fagosit dan bukan sekedar memberi bantuan sel B.^{29,30,51}

2.3. Peran *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator

Imunomodulator digunakan untuk memperbaiki sistem imun dengan cara stimulasi (imunostimulan) pada kondisi defisiensi imun dan menekan (imunosupresan) atau menormalkannya pada saat reaksi imun berlebihan.^{6,12} Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai immunomodulator adalah *Phyllanthus niruri L*²¹ atau sering disebut dengan Bahupatra, Bhumala, Chanca Piedra, Quebra Piedra, Pitirishi, stone breaker, memeniran, meniran, rami buah, tamalaka, dan turi hutan^{14,53}.

Kandungan kimia *Phyllanthus niruri L* berupa:

- a) Lignan (*phyllanthine, hypophyllantine, phytetraline, lintetralin, niranthin, nirtetralin, nirurin, niruside, niephyline*);
- b) Terpen (*cymene, limonene, lupeol, lupeol acetate*);
- c) Flavonoid (*quercetin, quercitrin, isoquercitrin, astragalin, rutine, physetinglucoside*);
- d) Lipid (*ricinoleic acid, dotriancontanoic acid, linoleic acid, linolenic acid*);
- e) Benzenoid (*methilsalisilate*);
- f) Alkaloid (*norsecurinine, 4-metoxinorsecurinine, entnorsecurinina, nirurine*);
- g) Steroid (*beta sitosterol*);
- h) Alcanes (*triacontanal, triacontanol*);
- i) dan lain-lain (*vitamin C, tannin, saponin*).^{14,20,54}

Phyllanthus niruri L telah digunakan pada *Ayurvedic medicine* selama lebih dari 2000 tahun untuk penyakit batu empedu, gonorrhoe, dan diabetes. Secara topikal dipakai untuk mengobati ulkus, luka, bengkak, dan gatal-gatal. Selain itu juga digunakan untuk gangguan hati, antiseptik, astringen, dan diuretik. Untuk gangguan pencernaan dipakai pada kondisi dispepsia, kolik, diare dan disentri.^{53,55} Pada *Ayurvedic Medicine* juga digunakan untuk pengobatan bronkhitis, lepra, anemia, dan asma.⁵⁶



Gambar 6. *Phyllanthus niruri L*

Sementara itu *Unani System of Medicine Herb* menggunakan *Phyllanthus niruri L* untuk luka dan disentri kronik. Buah digunakan untuk luka, scabies dan cacing gelang. Akar yang segar dipercaya baik untuk batu empedu. Campuran daun dan garam dipakai untuk mengobati scabies dan tanpa garam untuk mengobati luka dan memar. Infus dari akar dan daun merupakan tonik yang baik.

Di India lazim digunakan pada gigitan ular dan gangguan pencernaan.⁵⁶ Pemakaian secara tradisional juga digunakan untuk batu ginjal, batu kandung kemih, penyakit hati dan ayan^{13,14}.

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.^{6,57} 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 RSU Tangerang menunjukkan penyembuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan penggunaan placebo.⁶

Penggunaan utama *Phyllanthus* pada kebanyakan gangguan fungsi hati telah dibuktikan. *Phyllanthus* menghambat DNA polymerase – enzyme yang dibutuhkan untuk reproduksi virus hepatitis B dan mengikat HbsAg pada penelitian in vitro.^{53,55,57} Baru-baru ini juga diketahui adanya kasiat hepatoprotektif.^{21,33,58} *Phyllanthus niruri L* mencegah peningkatan GTP dalam serum maupun sitosol hepar dan kandungan flavanoidnya merupakan antioksidan yang berpotensi mencegah kerusakan sel hepar serta dipakai sebagai obat hepatoprotektif atau anti hepatotoksik. Hasil penelitian menggunakan tikus menunjukkan adanya efek dalam menormalkan penumpukan asam lemak pada liver setelah minum alkohol.^{57,59}

Efek serupa juga tampak pada infeksi HIV. Alkaloid ekstrak *Phyllanthus niruri L* menghambat *cytopathic effects* yang disebabkan oleh HIV-1 /HIV-2.⁵⁵ *Reperandusinic acid* mempunyai kemampuan anti-viral secara *in vitro*, menghambat replikasi HIV dan HTLV-I. Penelitian baru-baru ini menunjukkan efek *Phyllanthus* dalam menghambat serangan HIV-1 dan integrasi enzim HIV-1, *reverse transcriptase* dan *protease*. Ketika digunakan untuk penderita HIV positif, dapat mereduksi replikasi HIV¹.^{55,57}

Penelitian tentang manfaat *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator terus dilakukan. Beberapa diantaranya telah membuktikan manfaat imunostimulan pada kasus-kasus brucellosis kronis dan infeksi virus yang tidak dapat diobati dengan antibiotika. Beberapa jenis infeksi virus yang dapat diberikan *Phyllanthus niruri L* misalnya morbili, influenza, bronkhitis, rhinovirus, pneumonia⁶ dan herpes simplek. Penelitian lain pada mencit Balb/C memberikan kesimpulan bahwa efek *Phyllanthus niruri L* setingkat kotrimoksazol dalam pengendalian infeksi stafilokokus aureus¹³. *Phyllanthus* juga baik untuk terapi adjuvant pada kanker⁵⁷ dengan menunjukkan aktifitas antikarsinogenik dan antimutagenik pada penelitian *in vivo* dan *in vitro*¹².

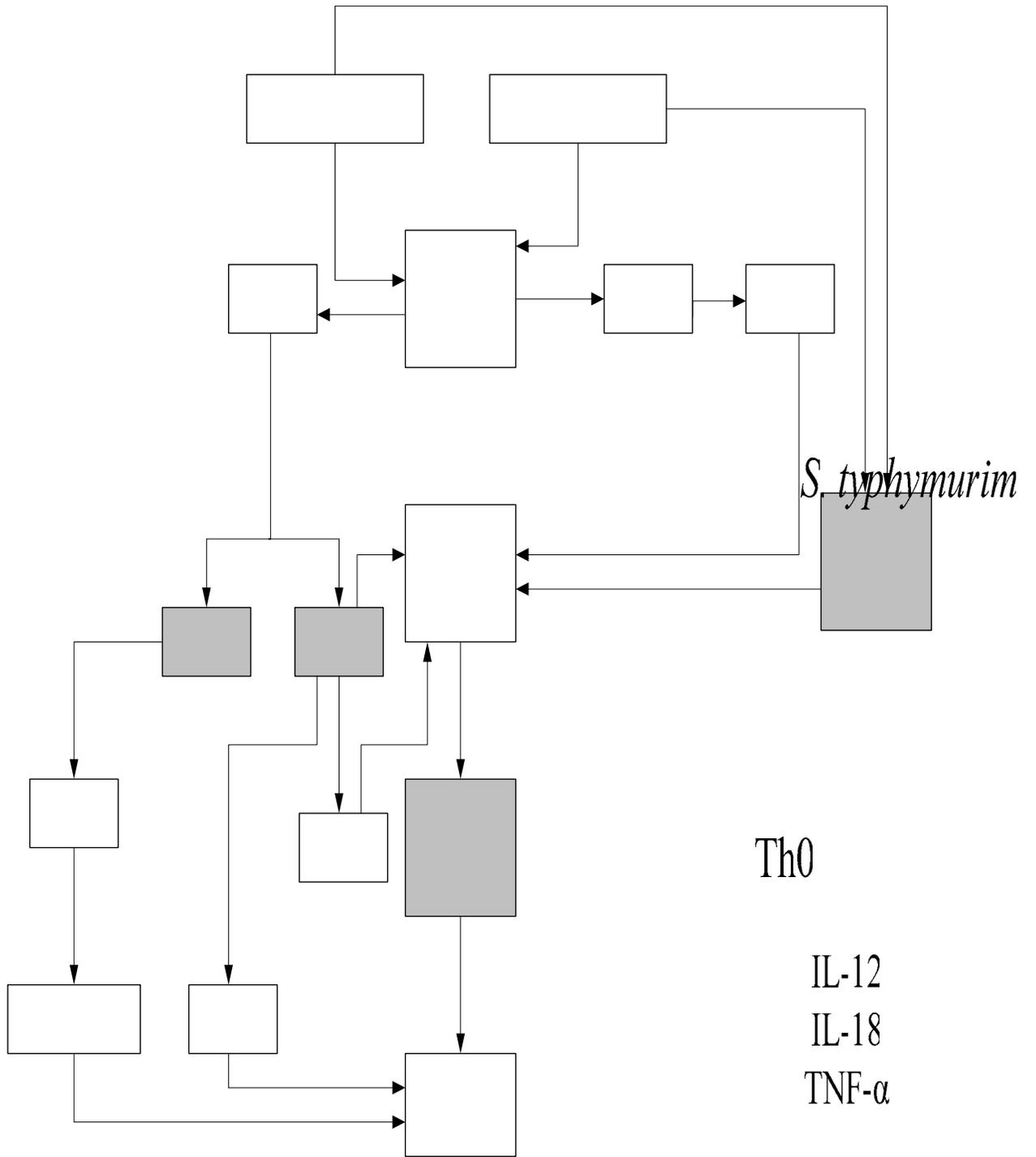
Dari hasil penelitian *in vitro*, pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* diketahui mempunyai efek terhadap respons imun nonspesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil,¹² sitotoksitas sel NK serta aktivasi komplemen.⁶ Terhadap respons imun spesifik pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* mempunyai efek meningkatkan proliferasi sel limfosit T, meningkatkan sekresi TNF α , IFN γ , dan IL-4 serta menurunkan sekresi IL-2 dan IL-10. Terhadap imunitas humoral, ekstrak *Phyllanthus niruri L* ini dapat meningkatkan produksi imunoglobulin M (IgM) serta imunoglobulin G (IgG).^{6,13,14,20}

Hal yang menarik bahwa *Phyllanthus* diduga kuat mempunyai efek antiinflamasi. *Phyllanthus* menunjukkan kemampuan menghambat nitrit oksida (NO) dan prostaglandin E-2 (PGE-2), menurunkan *endotoxin-induced nitric oxide synthase (iNOS)*, *cyclooxygenase (COX-2)*, dan menghambat produksi NF κ B secara *in vitro*. Juga menghambat induksi IL-1 β , IL-10, dan IFN γ pada *whole blood* serta reduksi TNF α secara *in vivo*. Penelitian pada binatang menunjukkan bahwa *Phyllanthus* meningkatkan aktifitas berbagai enzim antioksidan, seperti *superoxide dismutase (SOD)*, *catalase (CAT)*, *glutathione-S-transferase (GST)*, *glutathione peroxidase (GPX)*, dan *glutathione reductase (GR)*, di darah maupun jaringan yang tereduksi pada radioterapi, sehingga mereduksi kerusakan sel akibat radioterapi.^{57,58}

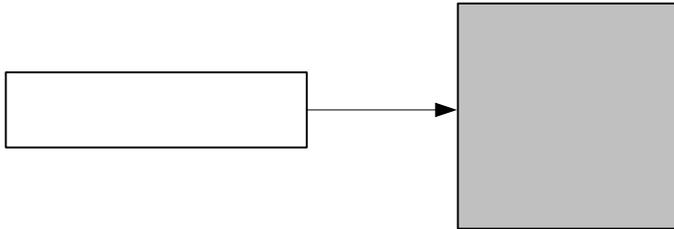
Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa *Phyllanthus niruri L* merupakan imunomodulator yang bukan hanya menaikkan, tapi juga mengendalikan sistem imun sehingga tetap

seimbang seperti prinsip *yin* dan *yang* dalam pengobatan Cina. Ini sangat penting mengingat bahwa reaksi imun dapat membahayakan diri sendiri apabila tidak terkontrol atau terjadi penurunan maupun peningkatan secara berlebihan.^{7,32,33}

2.4. Kerangka teori



2.5. Kerangka konsep



2.6. Hipotesa

Hipotesis mayor pada penelitian ini adalah adanya perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 125, 250 dan 500 μg selama 7 hari terhadap respons imunitas seluler pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.

Phyllanthus niruri L

Hipotesis minor pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

(125, 250 dan 500 μg)

- Jumlah leukosit darah tepi lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak *Phyllanthus niruri L*.
- Hitung jenis limfosit pada sediaan apus darah tepi lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak *Phyllanthus niruri L*.
- Gambaran morfologi limfosit teraktivasi lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak *Phyllanthus niruri L*.
- Produksi NO lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak *Phyllanthus niruri L*.
- Fungsi fagosit makrofag yang dinyatakan dalam indeks fagositosis lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak *Phyllanthus niruri L*.

Jml
Pro
Lim
Mor
Pro
Fag

2.7. Keterbatasan penelitian

Pada penelitian ini, sebaiknya dilakukan pemeriksaan kadar ROI, namun karena waktu paruhnya yang singkat dan metode yang digunakan masih sangat sulit, maka parameter yang dapat diperiksa adalah produksi NO makrofag.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang lingkup penelitian

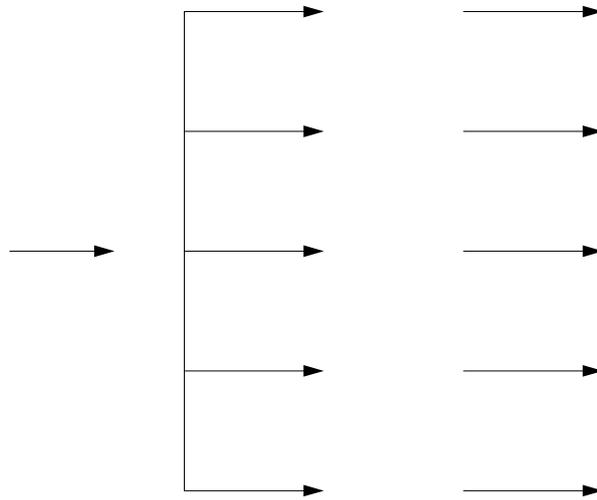
Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Patologi Klinik dan Ilmu Farmakologi dan Terapi, Ilmu Mikrobiologi serta Imunologi.

3.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Yogyakarta pada bulan Februari 2008.

3.3. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test-only control group*⁶¹ yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* yang dibuat oleh Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Baku Obat Universitas Diponegoro, pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan bakteri *Salmonella typhimurium*. Parameter pengukuran variabel berupa jumlah leukosit, prosentase dan gambaran morfologi limfosit, produksi NO makrofag dan fungsi fagositosis makrofag.



Keterangan:

X→R : Masa adaptasi selama 1 minggu

R : Randomisasi

P1 : Perlakuan 1, mencit diberi pakan standar, diinfeksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1 dan diberi larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* dengan dosis 3×250 µg/hari selama 7 hari per oral.

P2 : Perlakuan 2, mencit diberi pakan standar, diinfeksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1 dan diberi larutan *Phyllanthus niruri L* ekstrak dengan dosis 3×250 µg/hari selama 7 hari per oral.

P3 : Perlakuan 2, mencit diberi pakan standar, diinfeksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1 dan diberi larutan *Phyllanthus niruri L* ekstrak dengan dosis 3×500 µg/hari selama 7 hari per oral.

K1 : Kontrol positif, merupakan kontrol terhadap perlakuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L*. Mencit mendapat pakan standar dan diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1 tetapi tidak diberi *Phyllanthus niruri L*.

K2 : Kontrol negatif, merupakan kontrol sehat dimana mencit tidak diberi perlakuan apapun, hanya diberi pakan standar.

O1 : Observasi terhadap perlakuan 1

O2 : Observasi terhadap perlakuan 2

O2 : Observasi terhadap perlakuan 3

OK1 : Observasi terhadap kontrol positif

OK2 : Observasi terhadap kontrol negatif

Catatan: dosis pemberian larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* didasarkan pada konversi dosis manusia dewasa ke mencit menurut Laurence & Bacharach (1964) yaitu dosis manusia dikali 0,0026. Sementara itu dosis ekstrak *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator pada orang dewasa adalah 3 x 50 mg/hr sehingga didapatkan dosis untuk mencit 3 x 130 µg/hr. Untuk mengetahui dosis efektif maka dibuat rentang dosis bertingkat yaitu 3 x 125 µg/hr, 3 x 250 µg/hr, dan 3 x 500 µg/hr, pemberian dengan sonde per oral.

3.4. Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/c. Strain yang dipilih adalah Balb/c sebab strain ini dapat menimbulkan imunitas seluler apabila diinokulasi dengan *Salmonella typhimurium* hidup. Mencit Balb/c juga *susceptible* terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.

3.5. Sampel

3.5.1. Jumlah sampel

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan ketentuan dari WHO jumlah sampel minimal 5 pada tiap kelompok perlakuan.⁶⁰ Pada penelitian ini menggunakan

6 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor mencit, untuk mengantisipasi *drop out*.

3.5.2. Cara pengambilan sampel

Kriteria inklusi meliputi :

1. Galur murni Balb/c,
2. Jenis kelamin jantan,
3. Umur 8-10 minggu,
4. Berat badan 20-30 gram,
5. Aktif, sebelum diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan sampel adalah mencit mati sebelum tiba waktu observasi.

3.6. Variabel penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* dengan dosis bervariasi (125 μ g, 250 μ g dan 500 μ g). Sedangkan variabel tergantung penelitian adalah status imunologi, dalam penelitian ini diukur dengan parameter sebagai berikut :

- a) Jumlah leukosit diperiksa dengan alat auto hema-analiser
- b) Prosentase limfosit dari sediaan apus darah tepi diperiksa dengan sediaan apus darah tepi yang dilihat dibawah mikroskop cahaya dan dihitung persentasenya dalam 100 leukosit.
- c) Gambaran morfologi limfosit dari sediaan darah tepi diperiksa dengan sediaan apus darah tepi yang dilihat dibawah mikroskop cahaya.
- d) Produksi NO makrofag, diukur jumlah NO dari supernatan makrofag menggunakan reagen Griess dengan metoda modifikasi Griess dan Green dkk (1982) dan Ding dkk (1988).

- e) Kemampuan fagositosis makrofag diperiksa dengan menggunakan partikel *latex bead* yang dinyatakan dalam indeks fagositosis.

Variabel kendali penelitian ini adalah *Salmonella typhimurium* sebagai imunogen. *Salmonella typhimurium* yang digunakan adalah strain *Salmonella* virulen (Phage type 510) dengan LD₅₀ 10⁶ CFU, sehingga dosis yang digunakan untuk pemeriksaan imunitas seluler adalah 10⁵ CFU, yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP.

3.7. Definisi operasional

- a) *Phyllanthus niruri L* adalah larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* yang diberikan kepada kelompok perlakuan mencit Balb/C (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) melalui sonde lambung dengan dosis 3x125 µg/hr, 3x250 µg/hr, dan 3x500 µg/hr.
- b) Jumlah leukosit adalah leukosit dalam darah mencit Balb/c yang dihitung dengan analiser hematologi dimana dihitung berapa jumlah leukosit /mm³.
- c) Prosentase limfosit adalah prosentase jumlah limfosit dalam 100 leukosit yang dihitung dengan cara membaca dibawah mikroskop dari zona baca pada sediaan apus darah tepi dengan satuan %
- d) Gambaran morfologi limfosit adalah adanya gambaran morfologi sel limfosit yang teraktivasi dengan ciri sitoplasma lebar, warna biru dan inti atipik dan/atau kromatin agak longgar pada sediaan apus darah tepi dengan satuan jumlah limfosit teraktivasi pada 100 leukosit yang dihitung.
- e) Produksi NO makrofag adalah konsentrasi NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag yang diukur dengan reagen Griess dengan satuan µM.

f) Kemampuan fagositosis makrofag adalah prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang dihitung pada 200 sel dikali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan dalam indeks fagositosis. Pemeriksaan variabel gambaran morfologi limfosit dan kemampuan fagositosis makrofag untuk mengurangi subyektifitas, dilakukan oleh peneliti dan 2 analis yang berpengalaman dari LPPT UGM dan Laboratorium Patologi Klinik secara *blinded*, kemudian dihitung nilai kappa.

3.8. Alat dan bahan

3.8.1. Alat / instrumen penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang hewan, sonde lambung, spuit 1 cc steril, kaca objek, mikroskop cahaya, tabung reaksi, seperangkat alat bedah steril, inkubator CO2 5%, *laminar air flow*, *yellow* dan *blue tip*, *elisa reader*, pipet *Pasteur*, pipet *ependorf*, bilik hitung *neubauer improve*, sentrifugasi sigma 310 AK yang dilengkapi pengatur suhu, *microplate 24 well*, 96 *well* dasar rata, *thermanox plastic coverslip* diameter 13 mm, falcon max 15 ml *polypropylene conical tube*.

3.8.2. Bahan dan reagen penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan pakan ternak standar untuk mencit Balb/c, bakteri *Salmonella typhimurium* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP Semarang, larutan ekstrak *Phyllanthus Niruri L* yang dibuat di Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Baku Obat Universitas Diponegoro Semarang. Sampel berupa darah yang diambil dari pembuluh darah retroorbital mencit dengan menggunakan kapiler hematokrit dan cairan peritoneal mencit.

Reagen yang digunakan alkohol 70%, methanol 90% dan larutan giemsa, larutan *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*, *Bovine Serum (FBS)* 10%, penicillin, asam asetat 3%, *Latex Beads*, methanol absolute, Giemsa 20%, *Phosphate Buffered Saline(PBS)*, Reagen Griess (reagen

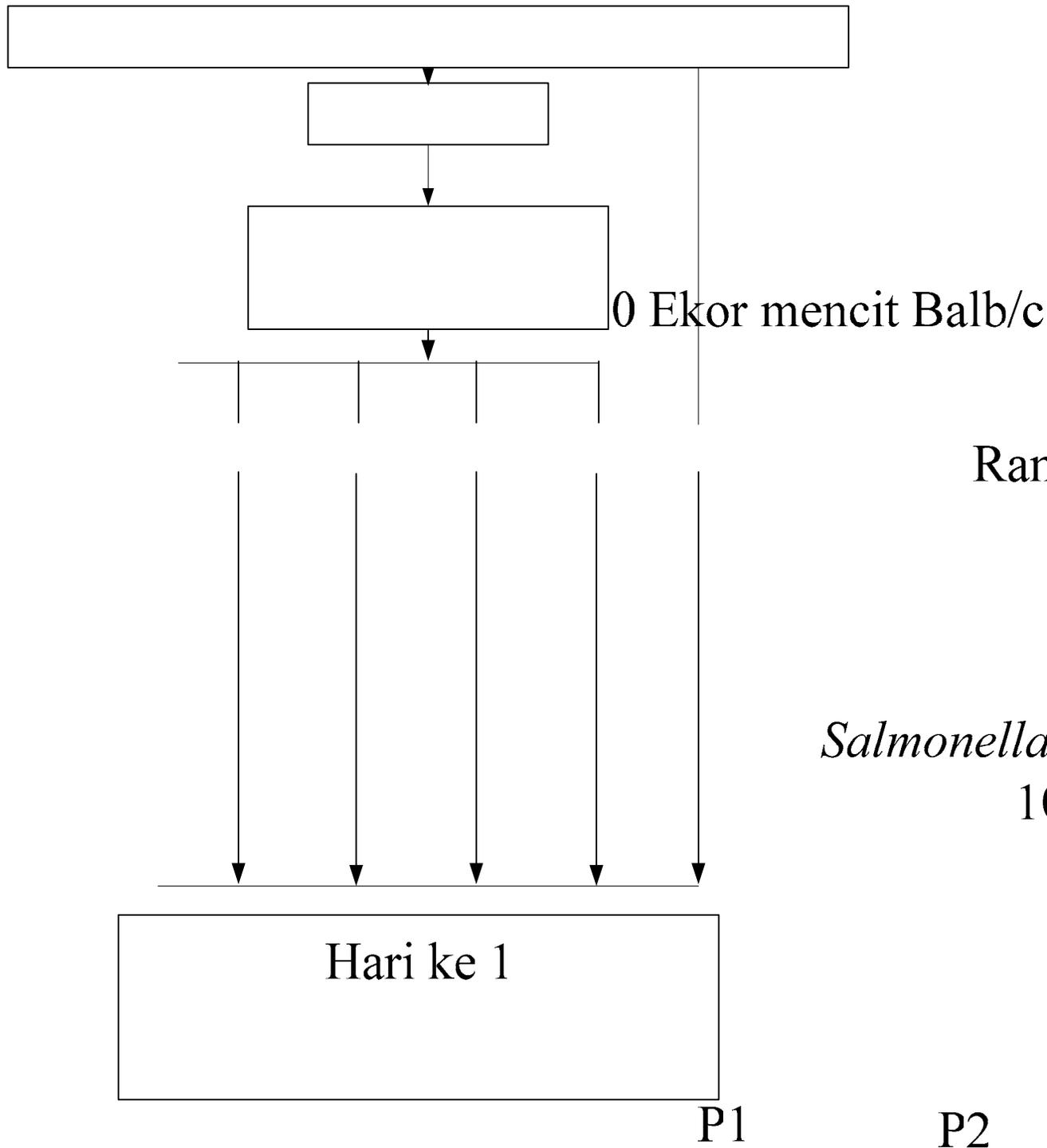
Chromogenic), *Canada Balsam*, aquades steril, media *Salmonella-Shigella*, media *Brain Heart Infution*.

3.9. Prosedur pengumpulan data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- a) Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- b) Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 30 ekor mencit dibagi dalam 5 kelompok.
- c) Kelompok P1-3 diberi pakan standar dan larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* setelah 12 jam injeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-1 dengan dosis yang sudah ditetapkan selama 7 hari. Pada hari ke-7 semua mencit diambil darahnya untuk pemeriksaan jumlah leukosit, hitung jenis dan gambaran morfologi limfosit, kemudian diterminasi untuk diambil cairan peritoneal untuk pemeriksaan NO dan kemampuan fagositosis makrofag.
- d) Kelompok K1 diberi pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal namun tidak diberi larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* dan kelompok K2, merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

3.10. Alur penelitian



3.11. Prosedur pemeriksaan

3.11.1. Prosedur pemeriksaan jumlah leukosit

iruri L

iruri L

Pemeriksaan jumlah leukosit dilakukan dengan cara, darah mencit yang diambil diberi antikoagulasi EDTA, dan dihitung jumlah leukosit dengan alat analiser hematologi. Pembacaan hasil jumlah leukosit disesuaikan dengan nilai rujukan hematologi untuk mencit.

3.11.2. Prosedur pemeriksaan prosentase dan gambaran morfologi limfosit

Langkah-langkah dalam pemeriksaan hitung jenis leukosit dan gambaran morfologi pada sediaan apus darah tepi, dengan prosedur pembuatan preparat sebagai berikut :

- a) Meneteskan darah pada garis tengah kaca objek kira-kira 1 cm dari ujung.
- b) Dengan tangan kanan diletakkan kaca objek lain disebelah kiri tetesan dan gerakkan ke kanan sampai menyentuh tetes darah.
- c) Darah akan menyebar pada sisi penggeser.
- d) Menggeserkan kaca ke kiri dengan memegangnya miring 45 derajat.
- e) Preparat dibiarkan kering di udara dan beri label.
- f) Preparat yang telah kering difiksasi dengan methanol 90%, dikeringkan kembali.
- g) Preparat diberi pewarnaan dengan larutan Giemsa dan didiamkan selama 20-25 menit.
- h) Mencuci preparat dengan air mengalir dan preparat dikeringkan
- i) Preparat sediaan apus darah tepi yang sudah kering dibaca di bawah mikroskop cahaya untuk menghitung prosentase dan gambaran morfologi limfosit
- j) Hasil pembacaan berupa hitung jenis dari leukosit terutama limfosit dalam prosentase dan gambaran sel limfosit yang teraktifasi

3.11.3. Prosedur pemeriksaan produksi NO

Untuk memeriksa produksi Nitrit Oksida digunakan 96 sumuran *microplate ELISA* dengan dasar rata, dengan cara sebagai berikut :

- a) Memasukkan 100µl reagen Griess (reagen *chromogenic*) dalam setiap sumuran

- b) Pipet 100 μ l supernatan yang akan dites dan standar NaNO ke dalam plate dengan triplikasi, Menggunakan medium kontrol sebagai blangko.
- c) Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilisasi.
- d) Mengukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader*.
- e) Membuat kurva standar menggunakan analisis regresilinier sederhana/simpel dari pembacaan NaNO, menghitung konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi.

Adapun cara pembuatan reagen *chromogenic* dan standar adalah sebagai berikut :

- a) Reagen 1 : N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml air suling.
- b) Reagen 2 : Sulfanilamide (Sigma) 1g dilarutkan dalam 100 ml 5%phosphoric acid
Keduanya harus disimpan pada lemari pendingin dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tak berubah warna menjadi lebih gelap.
Campurkan dengan volume sama banyak reagen 1 & 2 setiap akan digunakandan dapat digunakan dalam 1 jam setelah disiapkan.
- c) Nitrit standar : Larutkan 69 mg NaNO₂ dalam 500 ml air suling (2 mM stock), kemudian buat pengenceran bertingkat dari 0 – 200 μ M dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yg dipakai untuk kultur makrofag.

3.11.4. Prosedur pemeriksaan fagositosis makrofag dengan *Latex Beads*

prosedur isolasi makrofag mencit

Prosedur di bawah ini dilakukan untuk mendapatkan 5×10^5 sel/ml. Mencit diterminasi dengan dislokasi cervix. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan selubung peritoneumnya dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diinjeksi dengan 10 cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum. Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang

cukup banyak. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan ke dalam falcon 15 cc. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah sel dicuci dengan PBS sampai bersih.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10% ditambah penisilin pada pallet yang didapat. Sel-sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisiskan sel darah merah, kemudian diresuspensi lagi dengan medium RPMI komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Setelah itu sel dikultur dalam medium komplet di dalam *microplate* 24 sumuran yang dasarnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (*coverslip*), setiap sumuran 200 μ l (kepadatan 5×10^5 sel/ml), kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37 C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplet 1 ml dalam tiap sumuran dan diinkubasikan selama 2 jam. Setelah itu sel dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplet 1 ml dalam tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

Pemeriksaan fagositosis makrofag dengan *latex beads*

- a) Suspensi makrofag yang telah dikultur pada *microplate* 24 sumuran yang telah diberi *coverslip* bulat, setiap sumuran 200 μ l (5×10^5), inkubasikan dalam CO₂ 5% 37°C selama 30 menit.
- b) Tambahkan medium komplet 1 ml/ sumuran, inkubasikan selama 24 jam.
- c) Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2 kali.
- d) *Latex Beads* diresuspensikan sehingga mendapatkan konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml
- e) Tambahkan suspensi latex 200 μ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada inkubator CO₂ 5% 37°C.
- f) Cuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit
- g) Keringkan pada suhu kamar, fiksasi dengan methanol absolut
- h) Setelah kering, *coverslip* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit
- i) Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar

- j) Setelah kering *dimounting* pada kaca obyek
- k) Kemampuan fagosit dihitung dari prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang dihitung pada 200 sel dikali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan dalam indeks fagositosis.

3.12. Analisis statistik

Data yang diperoleh dilakukan *editing*, *coding* dan *entry* dalam file komputer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS versi 11,5. Analisis deskriptif menampilkan nilai rerata dan simpangan baku dari variabel tergantung (jumlah leukosit, hitung jenis limfosit, morfologi limfosit, produksi NO dan indeks fagositosis). Hasil dibuat dalam bentuk grafik *error bar*. Untuk uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene's test*. Data normal dan homogen dengan dilakukan uji *One way ANOVA* dilanjutkan *post hoc test Bonfferoni* ^{61,62} Data tidak normal ditransformasi dengan \log_{10} . Nilai signifikansi dalam penelitian, dengan hasil analisis $p < 0,05$.

BAB 4
HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan selama bulan Februari 2008 di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) UGM. Sampel penelitian pada awal dan akhir penelitian berjumlah 30 ekor mencit Balb/C.

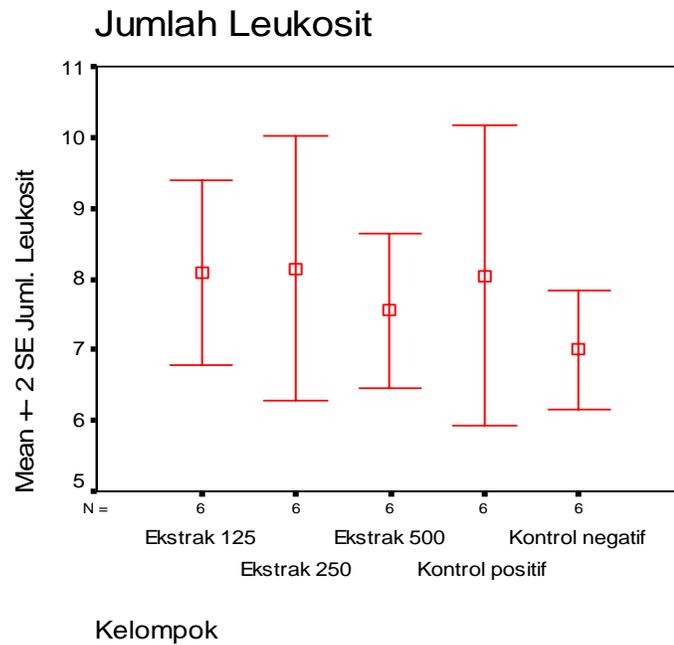
4.1. Jumlah leukosit

Jumlah leukosit diukur dengan menggunakan alat analiser hematologi otomatis dengan satuan ribu per mm³. Hasil analisis data jumlah leukosit disajikan pada tabel 1 dan gambar 7.

Tabel 1. Hasil analisis deskriptif jumlah leukosit

Kelompok	N	Rerata (SD) (ribu per mm ³)	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas bawah	Batas atas
P1	6	8,08 (1,59)	6,41	9,76
P2	6	8,15 (2,29)	5,75	10,55
P3	6	7,55 (1,33)	6,16	8,94
K1	6	8,05 (2,59)	5,33	10,77
K2	6	7,00 (1,02)	5,93	8,07

Keterangan : P1=125 µg; P2=250 µg; P3=500 µg; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif



Gambar 7. Grafik *Error Bar* Jumlah Leukosit

Rerata jumlah leukosit tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan PnL 250 μg (P2), yaitu 8,15 (SD 2,29) $/\text{mm}^3$ dan terendah pada kelompok kontrol sehat (K2) yaitu 7,00 (SD 1,02) $/\text{mm}^3$. Pada grafik *error bar* terlihat nilai rerata dari jumlah leukosit antara kelompok perlakuan dan kontrol tidak berbeda nyata.

Hasil analisis statistik menunjukkan distribusi data jumlah leukosit adalah tidak normal kemudian dilakukan transformasi data dengan transformasi Lg_{10} dan didapatkan distribusi normal, uji homegenitas homogen maka dilakukan uji beda dengan *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji beda tersebut didapatkan hasil tidak ada perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,870$.

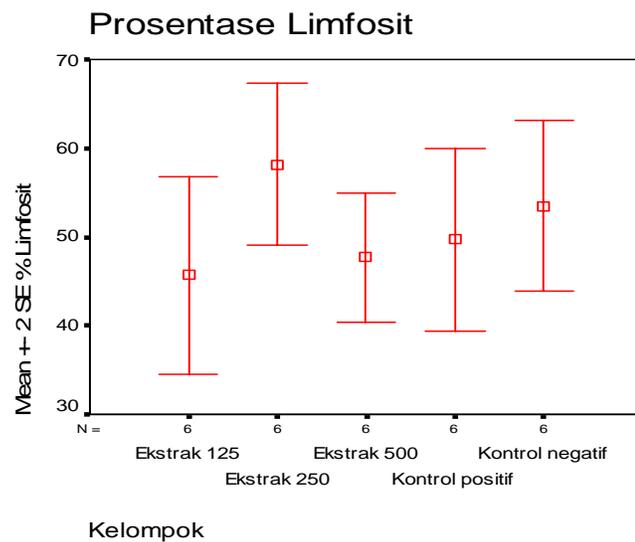
4.2. Prosentase limfosit

Presentase limfosit merupakan jumlah dari limfosit yang dihitung dalam 100 leukosit pada sediaan apus darah tepi dan dinyatakan dalam presentase. Tabel 2 dan gambar 8, menunjukkan analisis deskriptif dari presentase limfosit.

Tabel 2. Hasil analisis deskriptif presentase limfosit

Kelompok	N	Rerata (SD) (%)	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas bawah	Batas atas
P1	6	45,67 (13,62)	31,37	59,96
P2	6	58,17 (11,20)	46,42	69,92
P3	6	47,67 (8,94)	38,29	57,05
K1	6	49,67 (12,57)	36,48	62,85
K2	6	53,50 (11,76)	41,16	65,84

Keterangan : P1=125 µg; P2=250 µg; P3=500 µg; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif



Gambar 8. Grafik *Error Bar* presentase limfosit

Rerata presentase limfosit tertinggi terlihat pada kelompok PnL 250 µg (P2) yaitu 58,17 (SD 11,20) % dan terendah pada kelompok PnL 125 µg (P1) yaitu 45,67 (SD 13,62) %. Pada grafik *error*

bar terlihat rerata dari prosentase limfosit tidak berbeda secara nyata pada kelompok perlakuan maupun kontrol.

Dari analisis statistik, didapatkan hasil distribusi data prosentase limfosit adalah normal dan uji homegenitas homogen sehingga dilakukan uji beda dengan *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji beda tersebut didapatkan hasil tidak ada perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,387$.

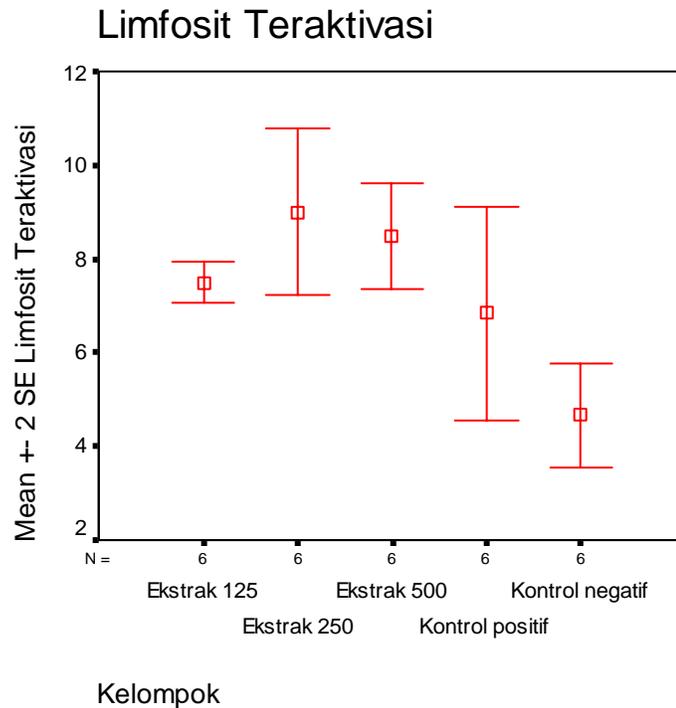
4.3. Gambaran morfologi limfosit teraktivasi

Gambaran morfologi limfosit teraktivasi merupakan jumlah limfosit teraktivasi dengan gambaran limfosit yang mempunyai sitoplasma lebar, warna lebih biru, inti bentuk atipik dan atau kromatin agak longgar, terdapat/tidak ada anak inti. Limfosit teraktivasi dihitung dengan cara hitung jenis sediaan apus darah tepi yaitu banyaknya limfosit teraktivasi per 100 leukosit. Hasil analisis data gambaran morfologi limfosit teraktivasi disajikan pada tabel 3 dan gambar 9.

Tabel 3. Hasil analisis deskriptif gambaran morfologi limfosit teraktivasi.

Kelompok	N	Rerata (SD)	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas bawah	Batas atas
P1	6	7,50 (0,55)	6,93	8,07
P2	6	9,00 (2,19)	6,70	11,30
P3	6	8,50 (1,38)	7,05	9,95
K1	6	6,83 (2,79)	3,91	9,76
K2	6	4,67 (1,37)	3,23	6,10

Keterangan : P1=125 µg; P2=250 µg; P3=500 µg; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif



Gambar 9. Grafik *Error Bar* gambaran morfologi limfosit teraktivasi.

Dari tabel 3 terlihat bahwa rerata jumlah limfosit teraktivasi tertinggi pada kelompok ekstrak PnL 250 μg (P2) yaitu 9,00 (SD 2,19) per 100 leukosit dan terendah pada kelompok kontrol negatif (K2) yaitu 4,67 (SD 1,37) per 100 leukosit. Pada grafik *Error bar* terlihat rerata dari limfosit teraktivasi terdapat perbedaan pada kelompok perlakuan dan kontrol, pada perlakuan cenderung meningkat dibanding kontrol. Pada kelompok perlakuan ekstrak PnL 250 μg (P2) rerata jumlah limfosit teraktivasi lebih tinggi dari rerata kelompok ekstrak PnL 125 μg (P1), tetapi pada kelompok ekstrak PnL 500 μg (P3) reratanya lebih rendah dari kelompok ekstrak PnL 250 μg (P2).

Dari analisis statistik, didapatkan hasil distribusi data limfosit teraktivasi adalah normal dan uji homogenitasnya homogen, sehingga dilakukan uji beda dengan *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji beda tersebut terdapat perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,003$ ($p < 0,05$). Dilanjutkan dengan uji hipotesis *post hoc test* Bonferroni untuk melihat

besar perbedaan antar kelompok. Besar perbedaan pada kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji *post hoc test* Bonferroni gambaran morfologi limfosit teraktivasi.

Kelompok		Mean <i>difference</i>	Std Error	P (IK 95%)
Ekstrak 125	250	-1,50	1,053	1,000 (-4,74;1,74)
	500	-1,00	1,053	1,000 (-4,24;2,24)
	K positif	0,67	1,053	1,000 (-2,57;3,91)
	K negatif	2,83	1,053	0,125 (-0,41;6,07)
Ekstrak 250	125	1,50	1,053	1,000 (-1,74;4,74)
	500	0,50	1,053	1,000 (-2,74;3,74)
	K positif	2,17	1,053	0,502 (-1,07;5,41)
	K negatif	4,33	1,053	0,004 (1,09;7,57)*
Ekstrak 500	125	1,00	1,053	1,000 (-2,24;4,24)
	250	-0,50	1,053	1,000 (-3,74;2,74)
	K positif	1,67	1,053	1,000 (-1,57;4,91)
	K negatif	3,83	1,053	0,012 (0,59;7,07)*
K positif	125	-0,67	1,053	1,000 (-3,91;2,57)
	250	-2,17	1,053	0,502 (-5,14;1,07)
	500	-1,67	1,053	1,000 (-4,91;1,57)
	K negatif	2,17	1,053	0,502 (-5,41;1,07)
K negatif	125	-2,83	1,053	0,125 (-6,07;0,41)
	250	-4,33	1,053	0,004 (-7,57;-1,09)*
	500	-3,83	1,053	0,012 (-7,07;-0,59)*
	K positif	-2,17	1,053	0,502 (-5,41;1,07)

* Uji Bonfferoni bermakna ($p < 0,05$)

Perbedaan bermakna terlihat pada kelompok ekstrak PnL 250 µg (P2) dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p = 0,004$). Terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok ekstrak PnL 500 µg dibandingkan kontrol negatif ($p = 0,012$). Pemberian ekstrak PnL dapat meningkatkan jumlah limfosit teraktivasi dibanding kelompok kontrol, akan tetapi peningkatan tidak menunjukkan perbedaan bermakna dengan peningkatan dosis.

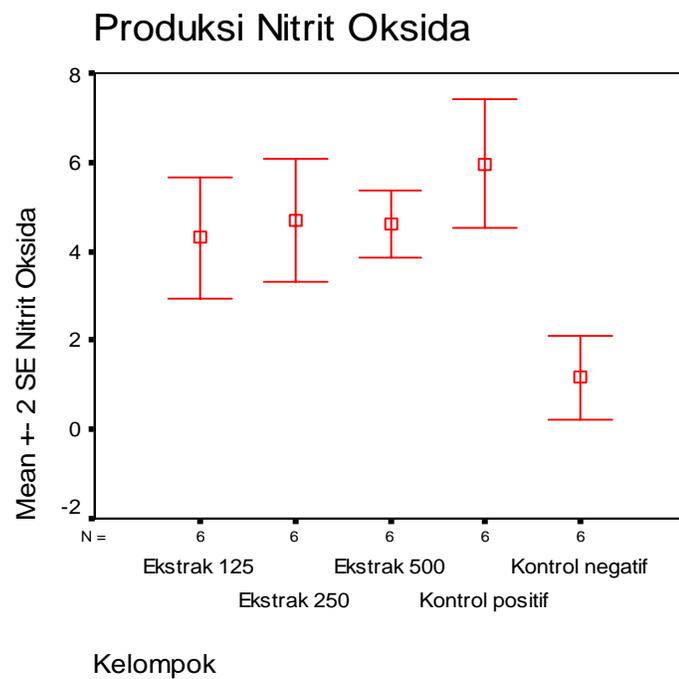
4.4. Produksi Nitrit Oksida makrofag

Produksi nitrit oksida makrofag dengan reagen Griess dengan satuan µM, menggunakan metode ELISA. Nilai absorben yang didapatkan kemudian dihitung menggunakan program KC4 3,03 sehingga didapatkan nilai kadar NO. Hasil pemeriksaan produksi NO dapat dilihat pada tabel 5 dan gambar 10.

Tabel 5. Hasil analisis deskriptif produksi NO makrofag.

Kelompok	N	Rerata (SD) (μM)	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas bawah	Batas atas
P1	6	4,31 (1,68)	2,55	6,06
P2	6	4,69 (1,70)	2,90	6,47
P3	6	4,62 (0,93)	3,64	5,59
K1	6	5,96 (1,76)	4,11	7,81
K2	6	1,17 (1,16)	0,05	2,39

Keterangan : P1=125 μg ; P2=250 μg ; P3=500 μg ; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif



Gambar 10. Grafik *error bar* produksi Nitrit Oksida makrofag

Dari tabel 5 terlihat bahwa rerata produksi nitrit oksida makrofag tertinggi pada kelompok kontrol positif (K1) yaitu 5,96 (SD 1,76) μM . Pada grafik *error bar* terlihat rerata dari produksi nitrit oksida terlihat ada perbedaan pada kelompok perlakuan dan kontrol, pada kelompok perlakuan rerata lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan ekstrak 250 μg

(P2) rerata produksi NO lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ekstrak 125 μg (P1) dan ekstrak 500 μg (P3).

Dari analisis statistik, didapatkan hasil distribusi data produksi NO adalah normal sehingga dilakukan uji beda dengan *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji beda tersebut terdapat perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,000$ dan dilanjutkan dengan uji *post hoc test* Bonferroni. Hasil uji *post hoc test* Bonferroni antar kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji *post hoc test* Bonfferoni produksi NO makrofag

Kelompok		Mean <i>difference</i>	Std Error	P	(IK 95%)
Ekstrak 125	250	-0,379	0,857	1,000	(-3,018;2,259)
	500	-0,311	0,857	1,000	(-2,949;2,328)
	K positif	-0,651	0,857	0,656	(-4,289;0,988)
	K negatif	3,136	0,857	0,012	(0,497;5,774)*
Ekstrak 250	125	0,379	0,857	1,000	(-2,259;3,018)
	500	0,069	0,857	1,000	(-2,569;2,707)
	K positif	-1,271	0,857	1,000	(-3,909;1,367)
	K negatif	3,515	0,857	0,004	(0,877;6,154)*
Ekstrak 500	125	0,311	0,857	1,000	(-2,328;2,949)
	250	-0,069	0,857	1,000	(-2,707;2,569)
	K positif	-1,340	0,857	1,000	(-3,978;1,298)
	K negatif	3,446	0,857	0,005	(0,807;6,085)*
K positif	125	1,651	0,857	0,656	(-0,987;4,289)
	250	1,271	0,857	1,000	(-1,367;3,909)
	500	1,340	0,857	1,000	(-1,298;3,978)
	K negatif	4,787	0,857	0,0001	(2,148;7,425)*
K negatif	125	-3,136	0,857	0,012	(-5,774;-0,497)*
	250	-3,515	0,857	0,004	(-6,154;-0,877)*
	500	-3,446	0,857	0,005	(-6,085;-0,807)*
	K positif	-4,787	0,857	0,0001	(-7,425;-2,148)*

* Uji Bonfferoni bermakna ($p < 0,05$)

Terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan ekstrak 125, 250 dan 500 μg (P1,P2,P3) dibanding kelompok kontrol negatif (nilai p secara berurutan = 0,012; 0,004; 0,005). Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dengan kontrol positif.

4.5. Kemampuan fagositosis makrofag

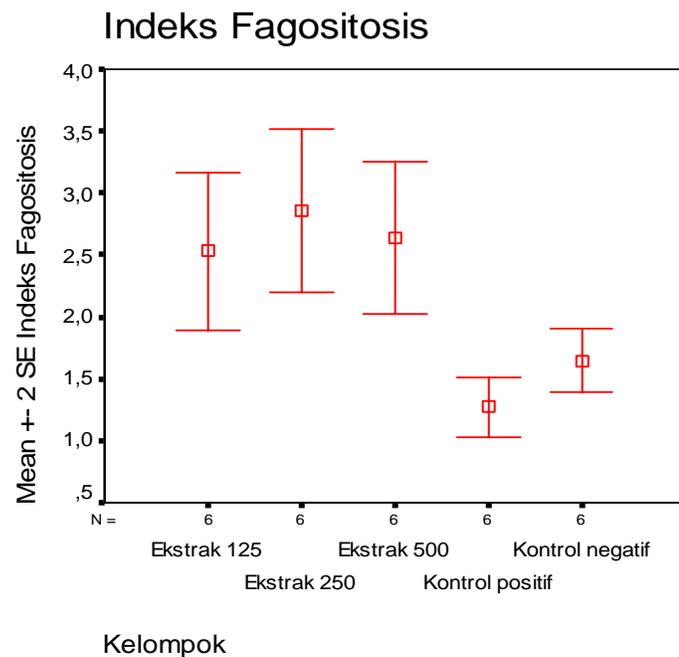
Kemampuan fagositosis makrofag dinyatakan sebagai indeks fagositosis. Hasil pembacaan kemampuan fagositosis disajikan pada tabel 7 dan gambar 11.

Tabel 7. Hasil analisis deskriptif indeks fagositosis.

Kelompok	N	Rerata \pm SD	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas bawah	Batas atas
P1	6	2,53 (0,78)	1,72	3,35

P2	6	2,85 (0,81)	2,01	3,70
P3	6	2,63 (0,75)	1,85	3,42
K1	6	1,27 (0,29)	0,96	1,58
K2	6	1,65 (0,32)	1,31	1,98

Keterangan : P1=125 µg; P2=250 µg; P3=500 µg; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif



Gambar 11. Grafik *error bar* indeks fagositosis

Dari tabel 7 terlihat bahwa rerata indeks fagositosis tertinggi pada kelompok perlakuan ekstrak 250 µg (P2) yaitu 2,85 (0,81) dan terendah pada kelompok kontrol positif yaitu 1,27 (0,29). Pada grafik *error bar* terlihat rerata dari indeks fagositosis terlihat ada perbedaan nyata pada kelompok perlakuan dan kontrol. Pada kelompok perlakuan ekstrak 250 µg (P2) rerata indeks fagositosis lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ekstrak 125 µg (P1) dan ekstrak 500 µg (P3).

Berdasarkan analisis statistik, didapatkan hasil distribusi data indeks fagositosis adalah normal dan uji homogenitas homogen sehingga dilakukan uji beda dengan *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji beda tersebut terdapat perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan dan

kelompok kontrol dengan $p = 0,001$. Untuk mengetahui besar perbedaan antara kelompok dilakukan uji hipotesis dengan uji *post hoc test* Bonfferoni yang dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil Uji *post hoc test* Bonfferoni indeks fagositosis

Kelompok		Mean difference	Std Error	P (IK 95%)
Ekstrak 125	250	-0,320	0,366	1,000 (-1,447;0,807)
	500	-0,100	0,366	1,000 (-1,227;1,027)
	K positif	1,263	0,366	0,020 (0,136;2,391)*
	K negatif	0,887	0,366	0,231 (-0,241;2,014)
Ekstrak 250	125	0,320	0,366	1,000 (-0,807;1,447)
	500	0,220	0,366	1,000 (-0,907;1,347)
	K positif	1,583	0,366	0,002 (0,455;2,711)*
	K negatif	1,207	0,366	0,029 (0,079;2,334)*
Ekstrak 500	125	0,100	0,366	1,000 (-1,027;1,227)
	250	-0,220	0,366	1,000 (-1,347;0,907)
	K positif	1,363	0,366	0,010 (0,236;2,490)*
	K negatif	0,986	0,366	0,124 (-0,141;2,114)
K positif	125	-1,263	0,366	0,020 (-2,391;-0,136)*
	250	-1,583	0,366	0,002 (-2,711;-0,455)*
	500	-1,363	0,366	0,010 (-2,490;-0,236)*
	K negatif	-0,376	0,366	1,000 (-1,504;0,751)
K negatif	125	-0,887	0,366	0,231 (-2,014;0,241)
	250	-1,207	0,366	0,029 (-2,334;-0,079)*
	500	-0,986	0,366	0,124 (-0,141;2,114)
	K positif	0,376	0,366	1,000 (-0,751;1,504)

* Uji Bonfferoni bermakna ($p < 0,05$)

Terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan ekstrak 125, 250 dan 500 μg (P1,P2,P3) dibanding kelompok kontrol positif (nilai p secara berurutan = 0,020; 0,002; 0,010). Tidak terdapat perbedaan bermakna antar masing - masing kelompok perlakuan. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan indeks fagositosis. Pada kelompok ekstrak 250 μg terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol positif maupun negatif ($p=0,002$ dan $p=0,029$), hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dosis 250 μg merupakan dosis yang lebih sesuai untuk meningkatkan indeks fagositosis makrofag.

BAB 5

PEMBAHASAN

Sesuai dengan hasil penelitian maka sistematika pembahasan dilakukan pada masing-masing variabel meliputi jumlah leukosit, prosentase limfosit, gambaran morfologi limfosit, produksi NO dan kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan dalam indeks fagositosis.

5.1. Jumlah leukosit

Peran leukosit terutama neutrofil untuk melawan infeksi *Salmonella typhimurium* terutama diperlukan pada fase ke-2, yaitu mulai hari I sampai III, di mana LPS dari *Salmonella typhimurium* akan mengaktivasi neutrofil, baik secara langsung maupun melalui aktifitas komplemen.^{16,28,63} Interaksi antara *Salmonella typhimurium* dan sel penjamu 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,³⁶ 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,³⁶ akibatnya akan terjadi peningkatan leukosit dalam darah (neutrofilia).

Untuk melakukan perannya, leukosit terutama neutrofil harus memiliki potensi yang kuat dalam jumlah, kemotaksis, dan fagositosis. Potensi tersebut dapat ditingkatkan dengan pemberian imunomodulator seperti *Phyllanthus niruri L.* Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa *Phyllanthus niruri L.* mampu meningkatkan kemotaksis neutrofil¹², yang pada hakekatnya akan mempengaruhi jumlah leukosit dan kecepatannya dalam mencapai area radang sehingga meningkatkan efektifitas dalam eliminasi bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari sampel darah yang diambil didapatkan rerata jumlah leukosit tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan PnL 250 μ g (P2), yaitu 8,15 (2,3) /mm³ dan terendah pada kelompok kontrol sehat (K2) yaitu 7,00 (1,1) /mm³, walaupun tidak ada perbedaan yang bermakna jumlah leukosit pada semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,870$,

namun pada kelompok PnL 125 µg (P1) dan 250 µg (P2) menunjukkan jumlah rerata yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok PnL 500 µg (P3). Pada penelitian ini, dosis 500 µg terjadi penurunan rerata jumlah leukosit, hal ini mungkin disebabkan karena adanya efek antiinflamasi *Phyllanthus niruri L*, di mana dosis 500 µg ekstrak *Phyllanthus niruri L* merupakan imunomodulator yang dapat menstimulasi respons imun tetapi sebaliknya juga bisa meregulasi respons imun yang berlebihan.⁶ Banyak kandungan biologi maupun kimia yang terdapat pada *Phyllanthus niruri L*^{14,20} dan beberapa diantaranya justru mempunyai efek antiinflamasi. *Phyllanthus* menunjukkan kemampuan menghambat produksi NFκB secara *in vitro*. NFκB sangat dibutuhkan untuk menginduksi IL-8 sebagai mediator utama bagi neutrofil.³⁶ *Phyllanthus* juga dapat menghambat induksi IL-1β dan IFNγ pada *whole blood* serta reduksi TNFα secara *in vivo*.⁽⁷⁾ IL-1β, IFNγ, dan TNFα, memiliki peran penting dalam proses radang akut termasuk diantaranya mengaktivasi leukosit terutama neutrofil.³⁶

5.2. Prosentase limfosit

Respons imun seluler akan teraktivasi untuk mengeliminasi infeksi terhadap bakteri intraseluler seperti *Salmonella typhimurium*, diantaranya dengan adanya proliferasi limfosit yang merupakan komponen *Cell Mediated immunity*. Limfosit secara genetik diprogram agar mampu mengenal antigen asing. Pengaruh pemberian ekstrak PnL pada penelitian ini dapat mengakibatkan prosentase limfosit yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan ekstrak 125 dan 250 (P1,P2) dibanding kontrol. Namun, berdasarkan uji beda didapatkan hasil tidak ada perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,387$.

Limfosit mengalami resirkulasi dari organ limfoid satu ke lainnya, ke saluran limfe dan darah, sehingga saat terjadi infeksi akan banyak limfosit yang terpajan antigen. Kemampuan mengenal antigen tersebut karena adanya reseptor pada permukaan sel limfosit. Limfosit yang teraktivasi akan segera membelah / proliferasi

dan akan mengekspresikan dan memproduksi sitokin yang dapat mengaktivasi proliferasi limfosit dalam organ limfoid.^{33,64}

Namun demikian pada kelompok perlakuan ekstrak 500 (P3) justru didapatkan jumlah prosentase limfosit lebih rendah dibanding kelompok ekstrak 250 (P2). Hal tersebut dapat disebabkan karena pada kelompok perlakuan dengan dosis 500 µg adanya efek antiinflamasi *Phyllanthus niruri L*, yang dapat bermanfaat sebagai imunomodulator yang dapat menstimulasi respons imun tetapi sebaliknya juga bisa meregulasi respons imun yang berlebihan.⁶

5.3. Gambaran morfologi limfosit teraktivasi

Faktor yang berperan dalam perubahan sel Th adalah limfokin yang mengaktifkannya. Jika berupa IL-2 dan IFN γ , yang berkembang adalah Th1 dan akan menekan Th2. Diferensiasi sel Th juga dipengaruhi oleh jenis APC. Jika APC-nya makrofag (sumber IL-12), yang akan berkembang adalah Th1, tetapi jika APC-nya sel B, yang berkembang Th2.^{17,32,33} Limfosit mengalami resirkulasi dari organ limfoid satu ke lainnya, ke saluran limfe dan darah, sehingga saat terjadi infeksi akan banyak limfosit yang terpajan antigen yang menyebabkan limfosit teraktivasi.^{33,64}

Pada infeksi bakteri intraseluler dan virus pada sediaan apus darah tepi dapat terlihat limfosit atipik / teraktivasi karena terpajan antigen dengan ciri limfosit yang lebih besar dan reaktif, sitoplasma lebih lebar, warna lebih biru atau abu-abu, inti oval, bentuk ginjal atau lobulated, kadang kadang terdapat anak inti dengan kromatin kasar.^{65,66}

Pada penelitian ini didapatkan gambaran morfologi limfosit yang teraktivasi pada sediaan apus darah tepi, pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol, dan terdapat perbedaan bermakna antara semua kelompok

perlakuan dan kelompok kontrol dengan $p = 0,003$ ($p < 0,05$). Setelah dilanjutkan dengan uji Bonfferoni didapatkan perbedaan bermakna pada kelompok ekstrak PnL 250 μg dan 500 μg (P2,P3) dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p = 0,004$ dan $0,012$), namun tidak ada perbedaan bermakna dengan kontrol positif ($p = 0,502$ dan $1,000$). Tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dan peningkatan dosis.

5.4. Produksi nitrit oksida makrofag

Hasil penelitian produksi NO makrofag pada kelompok menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada semua kelompok perlakuan dan kontrol dengan $p = 0,000$, namun demikian setelah dilakukan uji hipotesis dengan Bonfferoni, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dan kontrol positif (dengan nilai p secara berurutan $0,656$; $1,000$; $1,000$) dan terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan dibanding dengan kelompok kontrol negatif (nilai p secara berurutan = $0,012$; $0,004$; $0,005$). Setelah proses fagositosis, makrofag akan membunuh bakteri dengan membentuk NO yang bersifat toksik terhadap bakteri. Pemberian ekstrak PnL dapat meningkatkan produksi NO secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif namun tidak ada perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol positif, hal ini disebabkan karena berkaitan dengan aktifitas makrofag sebagai fagosit, baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol positif.

Selain itu, *Phyllanthus* diduga kuat mempunyai efek antiinflamasi. *Phyllanthus* menunjukkan kemampuan menghambat NO dan prostaglandin E-2 (PGE-2), menurunkan *endotoxin-induced nitric oxide synthase (iNOS)*, *cyclooxygenase (COX-2)*, dan menghambat produksi NF κ B secara *in vitro*.⁶⁷ Dari hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa PnL dapat meregulasi sistem imun agar terjadi keseimbangan dalam respons imun.

5.5. Kemampuan fagositosis makrofag

Makrofag sebagai fagosit profesional, melakukan sebagian fungsi efektor, setelah sel diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lainnya. Pemberian ekstrak PnL pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* ternyata mampu mengaktivasi makrofag yang ditandai dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag dibanding pada kelompok kontrol. Dalam penelitian ini kemampuan fagositosis makrofag dinyatakan sebagai indeks fagositosis, terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol dengan $p = 0,001$.

Respons imun natural dimulai dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi inang terhadap infeksi. Peran ini dilakukan oleh makrofag, sel NK, dan neutrofil.^{34,38,47} Adapun pengeluaran mediator inflamasi berfungsi untuk memperkuat respons imun²⁹. Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* diketahui mempunyai efek terhadap respons imun nonspesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil,¹² sitotoksitas sel NK serta aktivasi komplemen.⁶

Pada penelitian ini terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan ekstrak 125, 250 dan 500 μg (P1,P2,P3) dibanding kelompok kontrol positif (nilai p secara berurutan = 0,020; 0,002; 0,010). Tidak terdapat perbedaan bermakna antar masing - masing kelompok perlakuan dan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan indeks fagositosis, walaupun peningkatan tidak sejalan dengan peningkatan dosis.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

1. Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* Linn dengan dosis bervariasi tidak menunjukkan perbedaan bermakna pada jumlah leukosit, prosentase limfosit dan produksi NO makrofag antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.
2. Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* Linn dengan dosis bervariasi menunjukkan perbedaan bermakna pada limfosit teraktivasi dan kemampuan fagositosis antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, namun tidak ada perbedaan bermakna antar dosis.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melengkapi konsep dalam pemikiran penelitian ini antara lain :

- Pemeriksaan terhadap pengaruh dari pemberian ekstrak PnL dibandingkan dengan kombinasi ekstrak PnL dan antibiotika (misalnya: kloramfenikol), dengan harapan lebih mengetahui manfaat PnL sebagai terapi pendamping untuk meningkatkan imunitas seluler.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. Switzerland: WHO Publication; 2003.
2. Parry CM. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. In: Pietro mastroeni, ed. Salmonella infection: clininical, immunological and molecular aspects. UK and new York: Cambridge University Press; 2006.
3. WHO. Drug resistant salmonella. (Online). April 2005 (cited 27/02/07);(2 pages). Available from: URL: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs139/en/print.html>
4. Alwi I, Setiati S, Setiyohadi B, Simadibrata M, Sudoyo AW, editor. Buku Ajar Penyakit Dalam. Ed-4. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI; 2006: 1775.
5. Katzung BG. Farmakologi dasar dan klinik.. Ed-6. Jakarta :EGC; 1997 : 727
6. Munasir Z. Manfaat pemberian ekstrak phyllanthus niruri sebagai imunostimulator pada penyakit infeksi anak. (Online). 2002 (cited 12/1/07);(3pages). Available from: URL: <http://www.tnial.mil.id/cakrawala.php3>.
7. Kresno SB. Imunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium. Edisi keempat. Jakarta, Balai Penerbit FK.UI, 2001: 129-131
8. Abbas AK,Litchman AH, Pober JS. Celluler and molecular immunology. Fourth edition. Philadelphia; WB Saunders Co, 2003 : 1-16, 343-52
9. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiopoulus H, Fang FC. Antimicrobial action of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxidase synthase in experimental salmonellosis. Effect on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. J Exp Med, 2000: 192(2) : 227-36

10. Christever. Pengaruh meniran dan jombang dalam mengurangi reaksi peradangan secara makroskopis serta menekan jumlah eosinofil dalam darah pada dermatitis. Jakarta: Badan Litbang Kesehatan; 2001.
11. Harish V. *Phyllanthus niruri*. (Online). 2007 (cited 11/09/07);(17 pages). Available from: URL: <http://www.welcometohepatitis.com>.
12. Barbour EK, Sagherian VK, Talhouk RS, Harakh S, and Talhouk SN. Cell-Immunomodulation against *Salmonella enteritidis* in herbal extract-treated broilers. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2004;2:67-73.
13. Praseno, Nuryastuti T, dan Mustafa M. Perbandingan efikasi infusa meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan kotrimoksazol pada pengobatan infeksi kulit oleh *Staphylococcus aureus*. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 2001; 33:89-93.
14. Chodidjah. Pengaruh pemberian ekstrak (*Phyllanthus niruri* L) pada sel mononuklear terhadap viabilitas sel adenokarsinoma mama mencit C3H, penelitian invitro (tesis). Semarang 2003: Universitas Diponegoro.
15. WHO. Drug resistant salmonella. Fact shet N0 139. 2005. (cited 27/02/07) Available from: [URL:http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs139/en/print.html](http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs139/en/print.html)
16. Monack DM, Bouley DM, Falkow S. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1^{+/+}* Mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *JEM*. 2004;199:231-41.
17. Mastroeni P, Ménager N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J Med Microbiol* 2003;52:453-59.
18. Qutaishat SS. Transmission of *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 to infants through mother's breast milk. *Pediatrics*. 2003;111:1442-46.
19. Anonymus. *Phyllanthus*. *Journal of Hepatology*. 2003;38: 289-97

20. Radityawan D. Pengaruh *Phyllanthus niruri* sebagai imunomodulator terhadap kadar IFN- γ pada penderita tuberkulosis paru. *Dexa Media*. 2005.18:94-6.
21. Williams JE. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Alternative Medicine Review*. 2001; 6:567-79.
22. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, and Bäumlér AJ. The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype typhi reduces toll-like receptor-dependent Interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect. Immun*. 2005; 73:3367-74.
23. Zhang S. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun*. 2003; 71:1-12
24. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Mikrobiologi kedokteran*. Ed-1. Jakarta: Salemba Medika; 2005 : 364-7.
25. Anonym. Biological characters of *Salmonella*. (cited 28/05/2008) Available from : http://www.geocities.com/avinash_abhyankar/salmonella.jpg
26. Todar K. *Samonella and salmonellosis*. Madison: University of Wisconsin – Madison; 2005
27. Tumbelaka AR. Tatalaksana demam tifoid pada anak. *Pediatrics Update* 2003: 37-45
28. Giannella RA. *Salmonella*. In: Baron S, ed. on-line version of the *Medical Microbiology textbook*. 2004. (cited 21/06/06) Available from URL: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.htm>.
29. Irmawati I, Tjahjono, Dharmana E. Pengaruh jus Aloe Vera terhadap proliferasi limfosit, produksi reactive oxygen intermediate dan koloni kuman organ hepar mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *M Med Indonesia*. 2004;39:195-202.
30. Lehner MD. *Immunomodulation by endotoxin tolerance in murine models of inflammation and bacterial infection (dissertation)*. 2001. University of Konstanz.

31. Peterson JW. Bacterial pathogenesis. (cited 28/05/2008) Available from : http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/image/fig70_1.jpg
32. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, and Imboden JB. Medical immunology .10th ed. Singapore. McGraw-Hill. 2003.
33. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar .edisi-6. Jakarta: FKUI. 2004.p: 234-9
34. Zhang S. Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype Typhimurium-induced diarrhea. Infect. Immun. 2003; 71:1-12
35. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, and Bäumler AJ. The Vi capsular antigen of Salmonella enterica serotype typhi reduces toll-like receptor-dependent Interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. Infect. Immun. 2005; 73:3367-74.
36. Gewirtz AT. Salmonella typhimurium induces epithelial IL-8 expression via Ca²⁺-mediated activation of the NFκ-B pathway. J Clin Invest. 2000; 105:79-92.
37. Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsois RM, and Bäumler AJ. Secreted effector proteins of Salmonella enterica serotype typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. Infect. Immun. 2003;71:4795-4803
38. Cummings. FliC-Specific CD4+ T cell responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. The Journal of Immunology. 2005; 174:7929-38.
39. Mastroeni P. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma Interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 1999;67:478-83.
40. Elhofy A and Bost KL. Limited Interleukin-18 response in Salmonella-infected murine macrophages and in Salmonella-infected mice. Infect. Immun. 1999; 67:5021-26.
41. Wilson JW. Microarray analysis identifies Salmonella genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. PNAS. 2002;99: 13807-12.

42. Haraga A and Miller SI. A Salmonella enterica serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF- κ B-dependent gene expression. *Infect. Immun.* 2003;71:4052-8
43. Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, and Wigley P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis and Salmonella gallinarum. *Microbiology.* 2000; 146:3217-26.
44. Van der Velden AWM, Copass MK, and Starnbach MN. Salmonella inhibit T cell proliferation by a direct, contact-dependent immunosuppressive effect. *PNAS.* 2005;102:17769-74.
45. Prasetyo A, Gelu MFD, Yosefeta R, Nugroho DA, dan Kurniasari T. Pengaruh pemberian ekstrak *Pheretima aspergillum* terhadap perubahan histopatologik ileum, hepar, vesika fellea dan lien pada tikus Balb/ yang diinfeksi Salmonella typhimurium. *M Med Indonesia.* 2005;40:36-44.
46. Barrali RA. Salmonella Infection. 2006. (cited : 26/12/06) Available from: URL: <http://www.emedicine.com/emerg/topic515.htm#section>.
47. 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; 276:48431-9.
48. Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Bäumlér AJ, and Adams LG. Morphologic and molecular characterization of Salmonella typhimurium infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.* 2002;39:200-215
49. Kilhamn J, Lundin SB, Brevinge H, Svennerholm AM, and Jertborn M. T- and B-cell immune responses of patients who had undergone colectomies to oral administration of Salmonella enterica serovar typhi Ty21a vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2003; 10:426-30.

50. Torres AV, Causon JJ, Baumer AJ. Extraintestinal dissemination of salmonella by CD18 expressing phagocyte. (cited 28/05/2008) Available from : <http://www.nature.com/nature/journal/V.401/n67555/image/40>

51. Ugrinovic S, Ménager N, Goh N, and Mastroeni P. Characterization and development of T-cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6^{-/-}) mice with Salmonella enterica serovar typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2003; 71: 6808-19.

52. Srinivasan A, Foley J, Ravindran R, and McSorley SJ. Low-dose Salmonella infection evades activation of flagellin-specific CD4 T cells. *Journal of Immunology.* 2004;173: 4091-4099
53. Taylor L. Database File for: Chanca Piedra (*Phyllanthus niruri*). 2006. Available from: URL:<http://www.rain-tree.com/index.html>. (cited 25/1/07)

54. Elfahmi. Phytochemical and biosynthetic studies of Lignans, with a focus on Indonesian medicinal plants (dissertation). University of Groningen. 2006.

55. Naik AD and Juvekar AR. Effects of alkaloidal extract of *Phyllanthus niruri* on HIV replication. *Indian J Med Sci.* 2003; 57: 387-93.

56. Oudhia P. Bhuiaonla (*Phyllanthus niruri*): A useful medicinal weed. 2002. (cited 17/6/06) Available from: URL: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/default.html>.

57. Stagg J. *Phyllanthus*. 2006. (cited 17/6/07)Available from: URL : <http://www.supplementnews.org/phyllantus.html>.

58. Tabassum N, Chattervedi S, Aggrawal SS, and Ahmed N. Hepatoprotective studies on *Phyllanthus niruri* on paracetamol induced liver cell damage in albino mice. *JK-Practitioner.* 2005; 12:211-12.

59. Suharmi S dan Ustariana W. Pengaruh senyawa antihepatotoksik dalam infusa herba (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap efek toksik aflatoksin B1 (20 µg/ml) pada hepatosit tikus (*Rattus norvegicus*) terisolasi. *Berkala Ilmu Kedokteran.* 2000; 32:91-5.

60. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. Manila: Regional Office for the Western Pacific, 1993
61. Budiarto E. Biostatistika untuk kedokteran dan kesehatan masyarakat. Jakarta; EGC. 2002
62. Dahlan S. Statistika untuk kedokteran dan kesehatan. Editor: Susalit E, Wangge G, Setiawan H. Cetakan 1. Jakarta; PT Arkans. 2004: 31-111
63. Purwoko Y. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* (tesis). 2003. Semarang. Universitas Diponegoro.
64. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Sixth edition. Toronto; Mosby Elsevier Science limited 2001: 1-13
65. Tkachuk DC, Hirschmann JV, McArthur JR. Atlas of clinical hematology. WB Saunders, Philadelphia, 2002. p. 18
66. Benign white cells disorders. (cited 30/05/2008) Available from <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/image>
67. Kiemer, A. K., et al. Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. Elsevier Science, 2003