

**EFEK PHYLLANTHUS NIRURI L PADA PROSENTASE
NEUTROFIL, KOLONI BAKTERI LIMPA, DAN
HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT Balb/C YANG
DIINFEKSI SALMONELLA TYPHIMURIUM**

*The Effect of Phyllanthus niruri L in Neutrophil Percentages, Spleenic Bacterial
Colonies and Liver Histopathology of Balb/C Mice Infected by Salmonella
typhimurium*



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Sunarno
G4A005003**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

**Juni
2007**

TESIS

**EFEK PHYLLANTHUS NIRURI L PADA PROSENTASE NEUTROFIL,
KOLONI BAKTERI LIMPA, DAN HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT
Balb/C YANG DIINFEKSI SALMONELLA TYPHIMURIUM**

disusun oleh

Sunarno
G4A005003

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 18 Juni 2007
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

dr. Bambang Isbandrio, SpMK
NIP. 130 530 276

dr. Neni Susilaningsih, M.Si.
NIP. 131 832 243

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro

Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya 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 2007

Sunarno

RIWAYAT HIDUP

Nama : Sunarno
Tempat Tanggal Lahir : Raman Fajar, 12 April 1977
Agama : Islam
Alamat : Jl. Sam Ratulangi Gg. Bungsu, Penengahan,
Bandar Lampung

Riwayat Pendidikan

SDN 1 Raman Fajar : lulus tahun 1989
SMPN Raman Utara : lulus tahun 1992
SPK Depkes Metro : lulus tahun 1995
Akper Depkes Tanjung Karang : lulus tahun 2001
PSIK-FK Undip : lulus tahun 2005
Magister Ilmu Biomedik Undip : masuk tahun 2005

Riwayat Pekerjaan

Puskesmas Raman Utara : tahun 1995-1996
RSUD dr. H. Abdul Moeloek : tahun 1996-sekarang

Riwayat Keluarga

Istri : dr. Fitriana
Anak : -

KATA PENGANTAR

Tiada yang lebih utama daripada ungkapan syukur kepada Allah swt yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penyusunan tesis ini dapat terselesaikan. Salah satu bentuk kesyukuran adalah dengan memanfaatkan segala nikmat yang telah diberikan kepada kita baik yang ada di alam sekitar maupun yang ada dalam diri sendiri, termasuk kemampuan berfikir dan berkarya. Adapun judul dari tesis ini adalah “Efek *Phyllanthus niruri L* pada Prosentase Neutrofil, Koloni Bakteri Limpa, dan Histopatologi Hepar Mencit Balb/C yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*”, yang diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi kemajuan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.

Pada kesempatan ini kami hendak menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Bpk Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K) sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik PPs Undip Semarang beserta staf yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk menuntut ilmu pada Program Studi tersebut.
2. Bpk dr. Bambang Isbandrio, SpMK sebagai Pembimbing Utama yang dengan sabar menuntun kami dalam penyusunan usulan penelitian ini.
3. Ibu dr. Neni Susilaningsih, M.Si. sebagai Pembimbing Kedua yang telah banyak memberikan masukan-masukan berharga untuk memperbaiki kekurangan-kekurangan dalam penyusunan usulan penelitian ini.
4. Bpk Prof. dr. Edy Dharmana, Msc, PhD, Sp ParK. sebagai penguji I atas segala arahan dan nasehat yang diberikan.

5. Bpk dr. Noor Wijayahadi, MKes, PhD. sebagai penguji II atas segala koreksi dan masukan khususnya dalam metodologi penelitian dan bidang farmakologi.
6. Bpk dr. Udadi Sadhana, M.Kes, SpPA sebagai penguji III atas kesediaannya dalam memberikan petunjuk-petunjuk berharga dan bantuan dalam pemeriksaan laboratorium.
7. Bpk dr. Kasno, SpPA(K) sebagai narasumber I atas bantuan masukan-masukannya terutama dalam kaitannya dengan teknik pemeriksaan laboratorium.
8. Ibu dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes, SpPA sebagai narasumber II atas saran dan bantuan dalam pemeriksaan laboratorium.
9. DR. Bambang Cahyono, MSc beserta staf di Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Baku Obat Alam dan Agro Industri Undip yang telah membantu dalam pengadaan ekstrak *Phyllanthus niruri L.*
10. Orang tua, istri, dan seluruh keluarga atas dukungan moril dan materiil demi tercapainya cita-cita.
11. Rekan-rekan seperjuangan yang senantiasa memberikan dorongan dan dukungan serta seluruh pihak yang secara langsung dan tidak langsung turut berperan dalam penyelesaian penelitian ini.

Akhirnya dengan mengharap keridhaan Allah swt, semoga semua yang telah kita lakukan akan dicatat sebagai amal baik dan mendapat balasan di sisi-Nya. Amin

Semarang, Mei 2007

Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN	3
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	4
KATA PENGANTAR	5
DAFTAR ISI	7
DAFTAR TABEL	9
DAFTAR GAMBAR	10
DAFTAR LAMPIRAN	11
DAFTAR SINGKATAN	12
ABSTRAK	13
1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	15
1.2. Permasalahan Penelitian	17
1.3. Tujuan Penelitian	17
1.4. Manfaat Penelitian	18
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Antigen dan Virulensi Salmonella	19
2.2. Patogenesis Penyakit dan Respon Imun Terhadap Salmonella	21
2.3. Gambaran Umum dan Peran Neutrofil pada Sistem Imun	25
2.4. Peran <i>Phyllanthus Niruri L</i> Sebagai Immunomodulator	27
3. KERANGKA PENELITIAN DAN HIPOTESIS	
3.1. Kerangka Teori	32
3.2. Kerangka Konsep	33
3.3. Hipotesis	33
4. METODE PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian	34
4.2. Populasi	35
4.3. Sampel	36
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	36
4.5. Bahan dan Reagen Penelitian	37
4.6. Alat/instrumen Penelitian	38
4.7. Tempat dan Waktu	39
4.8. Prosedur Pengumpulan Data	39
4.9. Prosedur Pemeriksaan	40
4.10. Analisis Data	43
5. HASIL PENELITIAN	
5.1. Prosentase Neutrofil	44
5.2. Koloni Bakteri Limpa	46

5.3.	Gambaran Histopatologi Hepar	48
6.	PEMBAHASAN	
6.1.	Prosentase Neutrofil	51
6.2.	Koloni Bakteri Limpa.....	54
6.3.	Gambaran Histopatologi Hepar	57
7.	KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1.	Kesimpulan.....	59
7.2.	Saran.....	59
	DAFTAR PUSTAKA	61

DAFTAR TABEL

1. Perbedaan Prosentase Neutrofil	44
2. Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri Limpa	46
3. Hasil <i>Post Hoc test (LSD)</i> Jumlah Koloni Bakteri Limpa	48
4. Perbedaan Skor Histipatologi Hepar	48
5. Hasil <i>Post Hoc test (LSD)</i> Gambaran Histipatologi Hepar	50

DAFTAR GAMBAR

1. Diagram <i>Box-plot</i> Prosentase Neutrofil	45
2. Diagram <i>Box-plot</i> Jumlah Koloni Bakteri Limpa	47
3. Diagram <i>Box-plot</i> Gambaran Histopatologi Hepar	49

DAFTAR LAMPIRAN

1. Tabel HAI dengan *Knodell score*
2. *Ethical Clearence*
3. Rekapitulasi Hasil Laboratorium
4. Gambaran Koloni Bakteri *S. typhimurium* Organ Limpa pada Medium Agar
5. Gambaran Histopatologi Hepar
6. Out Put SPSS (Statistik Deskriptif Prosentase Neutrofil)
7. Out Put SPSS (Statistik Deskriptif Koloni Bakteri Limpa)
8. Out Put SPSS (Statistik Deskriptif Gambaran Histopatologi Hepar)
9. Out Put SPSS (*Oneway ANOVA dan Post Hoc test (LSD)*)
10. Pembuatan Ekstrak Meniran dengan Metode *Soxlet*

DAFTAR SINGKATAN

APC	: antigen presenting cell
CAT	: catalase
CD	: cluster designation
CFU	: colony forming unit
CMI	: cellular mediated immunity
COX	: cyclooxygenase
DNA	: deoxyribonucleic acid
GMCSF	: granulocyte macrophage colony stimulating factor
GR	: glutathione reductase
GPX	: glutathione peroxidase
GST	: glutathione-S-transferase
GTP	: guanosine triphosphate
HbsAg	: hepatitis B surface antigen
HE	: hematoxylin-eosin
HIV	: human immunodeficiency virus
HTLV	: human T cell lymphocyte virus
IFN γ	: interferon gamma
Ig	: immunoglobulin
IL	: interleukin
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
LPS	: lipopolysaccharide
MAC	: membrane attack complex
MHC	: mayor histocompatibility complex
NF κ B	: nuclear factor kappa B
NK	: natural killer
NO	: nitric oxide
PGE	: prostaglandin E
PMN	: polymorphonuclear
RES	: reticuloendothelial system
ROI	: reactive oxygen intermediate
RNI	: reactive nitrogen intermediate
ROS	: reactive oxygen species
SARs	: severe acute respiratory sindrome
SOD	: superoxide dismutase
TNF α	: tumor necrosis faktor alpha.
Th	: T helper
HAI	: Histology aktivitas index

ABSTRAK

Latar Belakang. *Phyllanthus niruri L* merupakan imunomodulator yang telah teruji dapat meningkatkan imunitas, khususnya imunitas seluler yang dibutuhkan untuk mengatasi infeksi *Salmonella*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan menilai prosentase neutrofil, koloni bakteri limpa, dan histopatologi hepar.

Metode. Penelitian ini menggunakan metode quasi eksperimen di laboratorium dengan rancangan *the post test-only control group* terhadap 18 ekor mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan dibagi dalam 3 kelompok. Kelompok kontrol diinfeksi *Salmonella typhimurium* tanpa pemberian *Phyllanthus niruri L*. Kelompok perlakuan diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi *Phyllanthus niruri L* dengan dosis masing-masing 3x 0,125 mg/hr (P1) dan 3x 0,25 mg/hr (P2).

Hasil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *Phyllanthus niruri L* mempengaruhi jumlah koloni bakteri limpa, di mana ada perbedaan antara kelompok kontrol dan P1 ($p=0,001$). Begitu juga pada gambaran histopatologi hepar, ada perbedaan antara kelompok kontrol dengan P1 ($p=0,022$) dan P2 ($p=0,008$). Akan tetapi pemberian *Phyllanthus niruri L* tidak terbukti mempengaruhi prosentase neutrofil ($p=0,287$).

Simpulan. Ada manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Kata kunci: *Phyllanthus niruri L*, *Salmonella typhimurium*, mencit Balb/C.

ABSTRACT

Background. *Phyllanthus niruri L* is an example of immunomodulator that has been clinically proved in increasing cellular immunity to handle with *Salmonella* infection. The purpose of this study was to prove the advantage of *Phyllanthus niruri L* on Balb/C mice infected by *Salmonella typhimurium* focusing on neutrophil percentages, splenic bacterial colonies, and liver histopathology.

Method. The study applied laboratory quasi-experimental design with post test-only control group to 18 Balb/C mice infected by *Salmonella typhimurium* divided into 1 control group and 2 experimental groups which's given *Phyllanthus niruri L* of 3x 0.125 mg/day (P1) and 3x 0.25 mg/day (P2) orally.

Result. The research result showed that the description of liver histopathology between control group and P1 was significantly different ($p=0.022$) and so as P2 ($p=0.008$). Furthermore, the bacterial colonies count between control group and P1 was also significantly different (0.001). On the other hand, the neutrophil percentages among groups were not significantly different ($p=0.287$).

Conclusion. There are advantages of *Phyllanthus niruri L* on Balb/C mice infected by *Salmonella typhimurium*.

keywords: *Phyllanthus niruri L*, *Salmonella typhimurium*, Balb/C mice

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Setiap saat manusia berinteraksi dengan lingkungan yang secara tidak disadari dapat memicu timbulnya berbagai macam penyakit. Terlebih lagi dengan adanya penyakit-penyakit berbahaya seperti SARS, flu burung, dan juga infeksi HIV yang sampai saat ini belum juga ditemukan terapi baku yang efektif. Di sinilah pentingnya sistem kekebalan atau imunitas yang akan melindungi tubuh dari partikel-partikel berbahaya seperti bakteri, virus, protozoa, jamur, dan lain sebagainya. Meskipun demikian, imunitas tubuh bagaikan pedang bermata dua, suatu saat sangat dibutuhkan tetapi di saat lain bisa membahayakan diri sendiri, misalnya pada kasus hipersensitif dan penyakit autoimun.^{1,2,3,4} Oleh karena itu berbagai upaya dilakukan untuk menjaga kestabilan sistem imun, termasuk di antaranya penggunaan imunomodulator.^{5,6}

Phyllanthus niruri L (Meniran) merupakan salah satu jenis imunomodulator yang telah teruji dapat meningkatkan imunitas pada binatang percobaan maupun manusia.^{7,8} Penggunaan *Phyllanthus niruri* L sebagai imunomodulator terus ditingkatkan terutama untuk infeksi virus. Pada infeksi bakteri digunakan sebagai terapi pendamping antibiotik, di mana sering terjadi masalah resistensi.^{9,10,11,12,13} Selain itu *Phyllanthus niruri* L merupakan suatu imunomodulator alami dari jenis tanaman yang tumbuh baik di Indonesia sehingga hal tersebut sejalan dengan program pemerintah untuk mengembangkan dan meningkatkan kualitas obat-obat tradisional.⁵

Sejalan dengan hal tersebut peneliti ingin menguji manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* pada infeksi Salmonella, sebagaimana diketahui bahwa untuk mengatasi penyakit tersebut dibutuhkan sistem imun yang kuat, terutama imunitas seluler yang dapat ditingkatkan dengan pemberian *Phyllanthus niruri L*.⁸ Selain itu penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan utama di negara-negara berkembang, khususnya Indonesia.^{11,13,14,15,16} Terbukti dalam dekade terakhir insiden penyakit typhoid yang disebabkan *Salmonella typhi* dan *paratyphi* di negara ini mencapai 350 – 810 per 100.000 penduduk per tahun.^{17,18}

Rancangan penelitian ini menggunakan model mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal yang dapat menyebabkan penyakit sistemik, serupa typhoid pada manusia. Pada perjalanan penyakitnya, bakteri akan menginvasi hepar dan limpa sehingga terjadi perubahan pada gambaran histopatologi organ tersebut. Biasanya akan tampak nekrosis multifokal yang disertai adanya koloni bakteri.¹⁷ Sementara itu sistem imun berfungsi untuk melawan patogen. Respon imun pada awal infeksi *Salmonella typhimurium* ditandai dengan serbukan sel PMN (neutrofil).^{14,15,19} Neutrofil merupakan garis pertahanan terdepan yang mampu bergerak aktif dan dalam waktu singkat berkumpul dalam jumlah sangat banyak di area radang.^{1,2,4} Dalam hal ini *Phyllanthus niruri L* berperan dalam meningkatkan kemotaksis neutrofil dan aktivitas komponen imun lain^{5,20,21} untuk mengeliminasi bakteri. *Phyllanthus niruri L* juga mempunyai efek hepatoprotektif yang dapat mencegah kerusakan sel hepar.^{22,23}

Adapun alasan digunakannya *serotype typhimurium* pada penelitian ini karena *serotype typhi* dan *paratyphi* seringkali tidak dapat menyebabkan timbulnya penyakit pada hewan kelas rendah seperti mencit.^{14,15,17,24,25} Sedangkan pemilihan model penelitian dengan menggunakan hewan coba (mencit) dilakukan karena penelitian melibatkan pemeriksaan organ hepar dan pengambilan limpa sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan pada manusia.

1.2. Permasalahan Penelitian

Masalah utama yang mendasari penelitian ini adalah “Apakah ada manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.” Dari permasalahan tersebut dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- 1) Apakah ada pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* pada prosentase neutrofil mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.
- 2) Apakah ada pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* pada jumlah koloni bakteri limpa mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.
- 3) Apakah ada pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* pada gambaran histopatologi hepar mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan *umum* dari penelitian ini adalah untuk membuktikan manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus penelitian adalah sebagai berikut:

- 1) Mendeskripsikan dan menganalisis pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* pada prosentase neutrofil mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.
- 2) Mendeskripsikan dan menganalisis pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* pada jumlah koloni bakteri limpa mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.
- 3) Mendeskripsikan dan menganalisis pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* pada gambaran histopatologi hepar mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian diharapkan bermanfaat untuk:

- 1) Kepentingan penelitian lanjutan tentang berbagai manfaat *Phyllanthus niruri L* khususnya pada penyakit infeksi.
- 2) Memperluas pengetahuan khususnya tentang manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. 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.^{18,26} Biasanya bakteri dikultur pada medium selektif seperti *Salmonella-Shigella Agar* untuk memisahkannya dari bakteri enterik lain.²⁷

Salmonella dibagi menjadi 3 serovar berdasarkan antigen utama yang dimiliki, yaitu O (*somatic*), Vi (*capsular/surface*) dan H (*flagellar*).^{13,26} Membran sel tersusun atas kompleks molekul glikolipid yang dikenal dengan nama lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin.²⁵ 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 merintangki aktivasi sel T, khususnya CD4 karena pada umumnya mereka lebih mengenali epitop peptida daripada polisakarida.^{1,2} Strain yang memiliki LPS lengkap juga resisten terhadap lisis komplemen jalur *membrane attack complex (MAC)*.^{25,27}

Salmonella typhimurium dapat menyebabkan penyakit sistemik pada binatang yang menyerupai typhoid pada manusia sehingga lazim dipakai untuk meneliti patogenesis penyakit tersebut.¹⁵ Meskipun demikian, *Salmonella typhi* dan *paratyphi* sebagai agen penyebab typhoid mempunyai antigen Vi¹³ yang tidak dipunyai oleh *Salmonella typhimurium*. Antigen Vi ini mampu mereduksi pengeluaran IL-8 yang berperan untuk menginduksi PMN (neutrofil). Oleh karena itu, pada awal infeksi *Salmonella typhimurium*, sel radang yang mendominasi adalah serbukan sel PMN, sedangkan pada infeksi *Salmonella typhi* dan *paratyphi* didominasi oleh serbukan sel mononuklear.^{14,19,28}

Salmonella dapat bertahan hidup dalam makrofag yang memfagositnya dan mampu melakukan multiplikasi di dalam fagosom yang tidak berfusi.^{29,30,31,32} Hambatan fusi fago-lisosom berhubungan dengan peningkatan survival intrasel dan virulensi bakteri, di mana *Salmonella* merespon lingkungan intrasel dengan meregulasi ekspresi protein tertentu.^{29,30,32,33,34} *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 sitoplastik.²⁷

Salmonella juga mempunyai kemampuan bermultiplikasi dalam parenkhim sel non fagosit, seperti hepatosit dan epitel intestinal.^{16,29} Di dalam sel, mikroba ini tinggal dalam vakuola yang berikatan dengan membran. Hal ini memungkinkannya terlindungi dari makrofag dan respon humoral. Tetapi, antigen

bakteri yang mencapai sitoplasma akan didegradasi dan menghasilkan fragmen peptida yang berikatan dengan MHC I untuk dipresentasikan ke CD8.^{27,35}

2.2. Patogenesis Penyakit dan Respon Imun Terhadap Salmonella

Salmonella patogenik mempunyai urutan gen invasif,^{29,30,32,33,34} menghasilkan protein yang disekresi oleh bagian khusus untuk menghancurkan epitel. Salmonella yang masuk ke dalam saluran pencernaan akan menembus epitel illeosekal²⁸ dan bermultiplikasi dalam folikel limfoid intestinal,⁹ 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.^{15,17,25,27,36}

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 interselluler. 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.^{17,36,37,38,39}

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 hyperemia, 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.¹⁷

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 respon imun dan peran makrofag serta sel NK dengan dikeluarkannya sitokin seperti IFN γ dan TNF α . Pada gambaran histopatologi mungkin tampak splenitis, nekrosis multifokal dan sering disertai dengan koloni bakteri.¹⁷

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.^{9,16,25,26,27}

Respon imun terhadap salmonella meliputi sistem imun natural (innate) dan sistem imun adaptif (acquired).^{16,35} Sistem imun natural berfungsi untuk mengidentifikasi dan melawan mikroba serta penanda imun adaptif untuk hadir.¹⁰ Respon 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.^{15,29,37} Adapun pengeluaran mediator inflamasi berfungsi untuk memperkuat respon imun.²⁷

Makrofag mensekresi IL-1, -6, -8, -12, -15, -18 dan TNF alfa.^{1,16,30} Interleukin -1, -6, dan TNF alfa bekerja sinergis untuk meningkatkan aktivasi sel T dan respon radang akut. Interleukin -8 membantu menarik neutrofil ke tempat infeksi.^{1,19,33,38} 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 respon inflamasi, fungsi antimikrobal PMN, stimulasi CD8 serta perkembangan, survival, dan fungsi sel NK. Interleukin -18 menginduksi IFN γ , ko-aktivasi Th1, dan perkembangan sel NK.^{30,31} Makrofag juga mengeluarkan ROI dan RNI yang dapat meningkatkan mekanisme killing. Makrofag mampu

menghancurkan bakteri dengan respiratory burst yang menghasilkan reactive oxygen species (ROS) seperti superoksida, hydrogen peroksidase dan NO.1,2,27,30

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 (GM-CSF). IFN γ meningkatkan sejumlah reseptor TNF alfa dan transkripsi mRNA. Sebaliknya TNF alfa dibutuhkan untuk produksi IFN γ . IFN γ meningkatkan respon 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.1,10,16,27

Neutrofil mampu menghasilkan oxidative burst seperti makrofag yang berkontribusi dalam killing bakteri. Nitrit oksida (NO) diproduksi bersama dengan L-sitruilin melalui oksidasi enzimatik dari L-arginin. Produksi NO distimulasi oleh IFN γ , TNF alfa, IL-1 dan IL-2. Nitrit oksida merupakan implikasi respon 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.1,2,27 Penjelasan lebih lanjut tentang neutrofil akan diterangkan pada sub bagian berikutnya.

Sementara itu pada imun adaptif sel yang berperan adalah APC, sel T dan sel B.16,24,30,35 Sel dendritik merupakan APC yang penting dalam inisiasi respon imun yang diperantarai sel T dan bersama dengan makrofag

mempresentasikan antigen yang diproses dari bakteri intrasel gram negatif seperti Salmonella.^{10,16,35} 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.^{1,2,10,16,27}

Sel T diperlukan untuk ekspresi penuh imunitas terhadap Salmonella.^{29,31,35} Cluster designation 4 (CD4) berfungsi dalam membantu aktivasi dan diferensiasi sel B. Selain membantu sel B membentuk antibodi, 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 fagosit.³⁵ 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 mengaktifkan fagosit dan bukan sekedar memberi bantuan sel B.^{1,16,27}

2.3. Gambaran Umum dan Peran Neutrofil pada Sistem Imun

Neutrofil berasal dari sel induk yang sama dengan monosit. Neutrofil muda mempunyai inti lebih besar yang tidak terbagi dalam lobus-lobus. Sel ini dikenal dengan nama *stab cell* atau neutrofil batang.⁴ Sementara itu pada sel yang

telah matang, kromatin inti memadat dan membentuk lobus-lobus yang dihubungkan satu sama lain dengan benang-benang halus. Sel ini dikenal dengan nama leukosit PMN atau neutrofil segmen, yang ditandai dengan inti multilobus dan tumpukan granula pada sitoplasmanya.^{1,2} Granula primer mengandung enzim antibakteri yang disebut mieloperoksidase dan mulai terbentuk pada tahap promielosit, yaitu stadium lanjut dari mieloblast.¹ Sedangkan granula sekunder mengandung lisozim, laktoferrin dan reseptor membran yang terbentuk pada tahap mielosit. Pada tahap metamielosit terbentuk granula yang berisi gelatinase.⁴

Maturasi sel terjadi di sumsum tulang dan tersimpan sebagai cadangan sekitar 5 hari sebelum dilepaskan ke dalam sirkulasi darah. Setelah dilepaskan dalam sirkulasi darah neutrofil tidak mempunyai kemampuan untuk membelah diri dan akan mengalami apoptosis kurang dari 12 jam.¹ Bila ada rangsangan untuk meningkatkan jumlah granulosit dalam darah, sel muda mungkin muncul pada pemeriksaan darah tepi.^{3,4}

Neutrofil sangat efektif dalam mempertahankan tubuh dari partikel berbahaya terutama bakteri. Syarat pertahanan antibakteri meliputi keadekuatan dalam jumlah, respon kemotaksis, dan kemampuan menelan serta membunuh.⁴ Neutrofil bergerak aktif dan dalam waktu singkat berkumpul dalam jumlah yang banyak di area radang. Respon yang cepat ini dipengaruhi agen kemotaktik dari produk mikroba, produk sel yang rusak dan mediator inflamasi terutama IL-8.^{14,19} Neutrofil melakukan fagositosis dan memecah berbagai partikel serta mampu melepaskan enzim sitoplasmanya ke area sekitar. Aktivitas neutrofil dibantu oleh peran antibodi (komplek imun) dan komplemen (C3 dan C5).^{1,2,4}

Pemeriksaan neutrofil meliputi pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif. Salah satu pemeriksaan kuantitatif adalah pemeriksaan jumlah neutrofil dalam bentuk prosentase terhadap jumlah leukosit. Nilai normal pada orang dewasa adalah 2 – 6 % untuk neutrofil batang dan 50 – 70 % untuk neutrofil segmen. Sedangkan nilai normal pada mencit adalah 12 – 30 %. Jika jumlah leukosit diketahui maka jumlah neutrofil dapat ditentukan dengan satuan (sel/mm³). Jumlah yang melebihi nilai normal disebut neutrofilia dan jumlah yang kurang dari nilai normal disebut neutrofenia.^{40,41}

2.4. Peran *Phyllanthus Niruri L* Sebagai Immunomodulator

Imunomodulator digunakan untuk memperbaiki sistem imun dengan cara stimulasi (imunostimulan) pada kondisi defisiensi imun dan menekan (imunosupresan) atau menormalkannya pada saat reaksi imun berlebihan.^{5,42} Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai immunomodulator adalah *Phyllanthus niruri L*⁸ atau sering disebut dengan Bahupatra, Bhuimala, Chanca Piedra, Quebra Piedra, Pitirishi, stone breaker, memeniran, meniran, rami buah, tamalaka, dan turi hutan.^{21,43}

Kandungan kimia *Phyllanthus niruri L* berupa:

- 1) Lignan (*phyllanthine, hypophyllantine, phyltetraline, lintetralin, niranthin, nirtetralin, nirurin, niruside, niephyline*);
- 2) Terpen (*cymene, limonene, lupeol, lupeol acetate*);
- 3) Flavonoid (*quercetin, quercitrin, isoquercitrin, astragalin, rutine, physetinglucoside*);
- 4) Lipid (*ricinoleic acid, dotriancontanoic acid, linoleic acid, linolenic acid*);

- 5) Benzenoid (*methilsalisilate*);
- 6) Alkaloid (*norsecurinine, 4-metoxinorsecurinine, entnorsecurinina, nirurine*);
- 7) Steroid (*beta sitosterol*);
- 8) Alcanes (*triacontanal, triacontanol*);
- 9) dan lain-lain (*vitamin C, tannin, saponin*).^{6,20,21}

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, astringent, dan diuretik. Untuk gangguan pencernaan dipakai pada kondisi dyspepsia, kolik, diare dan disenteri.^{43,44} Pada *Ayurvedic Medicine* juga digunakan untuk pengobatan bronkhitis, lepra, anemia, dan asma.⁴⁵

Sementara itu *Unani System of Medicine Herb* menggunakan *Phyllanthus niruri L* untuk luka dan disenteri 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.⁴⁵ Pemakaian secara tradisional juga digunakan untuk batu ginjal, batu kandung kemih, penyakit hati dan ayan.^{21,46}

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.^{5,7} Lebih lanjut penggunaan ekstrak *Phyllanthus niruri* L sebagai ajuvan dengan obat antituberkulosis juga menunjukkan perbaikan yang bermakna dibandingkan dengan plasebo. Demikian juga penelitian pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai ajuvan pada terapi varisela di Bagian Kulit RSUD Tangerang menunjukkan penyembuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan penggunaan placebo.⁵

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*.^{7,43,44} Baru-baru ini juga diketahui adanya kasiat hepatoprotektif.^{8,23,44} *Phyllanthus niruri* L mencegah peningkatan GTP dalam serum maupun sitosol hepar dan kandungan flavonoidnya 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.^{7,22}

Efek serupa juga tampak pada infeksi HIV. Alkaloid ekstrak *Phyllanthus niruri* L menghambat *cytopathic effects* yang disebabkan oleh HIV-1 /HIV-2.⁴⁴ *Repandusinic 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 HIV.^{7,8}

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, pneumonia⁵ dan herpes simplek. Penelitian lain pada mencit Balb/C memberikan kesimpulan bahwa efek *Phyllanthus niruri L* setingkat kotrimoksazol dalam pengendalian infeksi stafilokokus aureus.⁴⁶ *Phyllanthus* juga baik untuk terapi adjuvant pada kanker⁷ dengan menunjukkan aktifitas antikarsinogenik dan antimutagenik pada penelitian *in vivo* dan *in vitro*.²¹

Dari hasil penelitian *in vitro*, pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* diketahui mempunyai efek terhadap respon imun nonspesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil,⁴² sitotoksitas sel NK serta aktivasi komplemen.⁵ Terhadap respon 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).^{5,20,21,46}

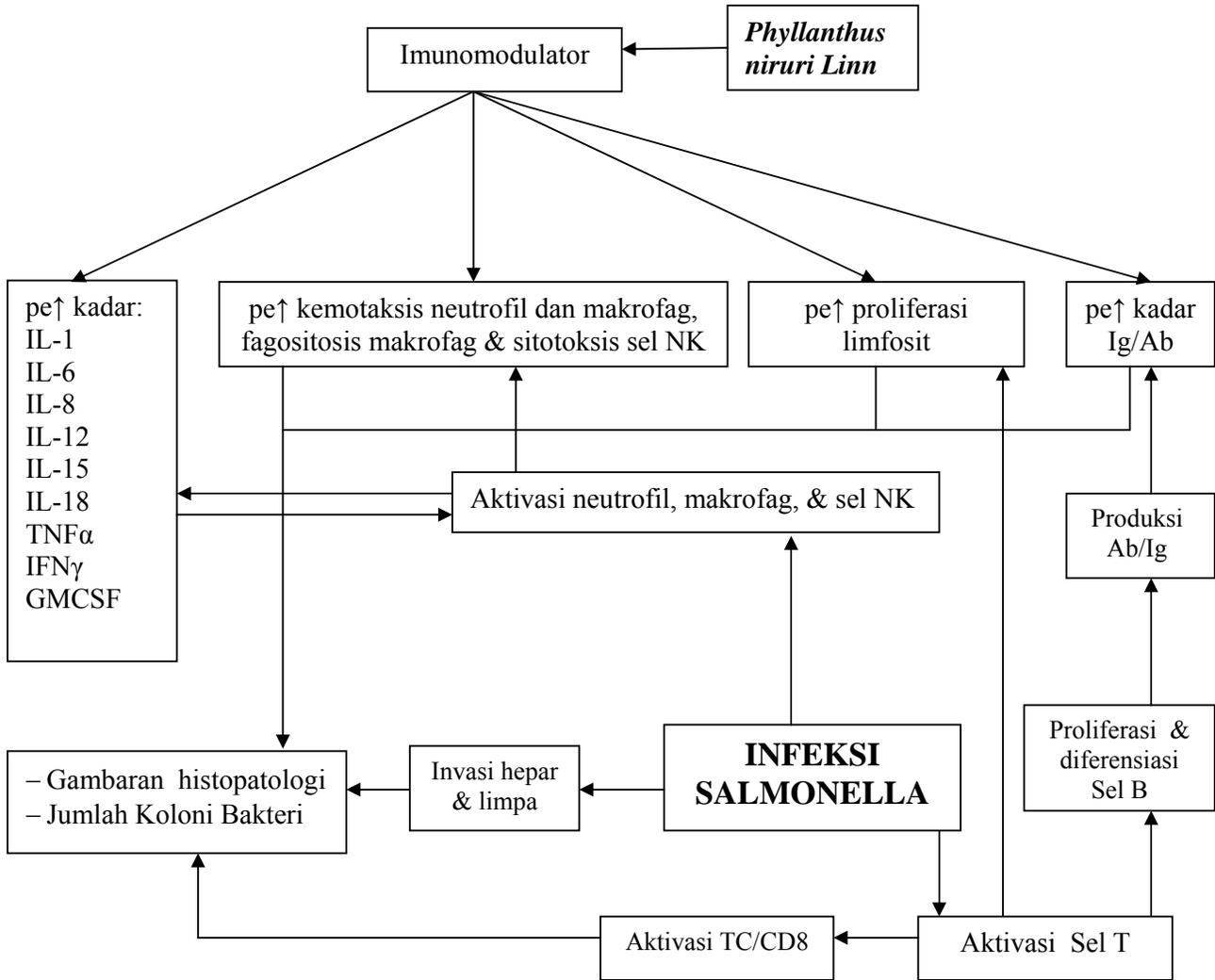
Hal yang menarik bahwa *Phyllanthus* diduga kuat mempunyai efek antiinflamasi. *Phyllanthus* menunjukkan kemampuan menghambat nitrit oksida

(NO) dan prostaglandin E-2 (PGE-2), menurunkan *endotoxin-induced nitric oxide synthase (iNOS)*, *cyclooxygenase (COX-2)*, dan menghambat produksi NFκB secara *in vitro*. Juga menghambat induksi IL-1β, IL-10, dan IFNγ pada whole blood serta reduksi TNFα 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.⁷

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa *Phyllanthus niruri L* merupakan immunomodulator 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.^{1,2,3}

3. KERANGKA PENELITIAN DAN HIPOTESIS

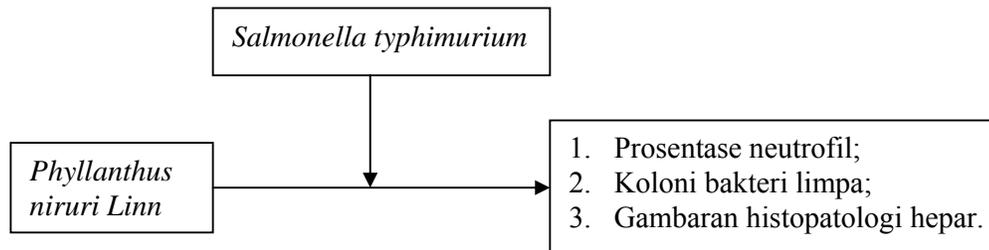
3.1. Kerangka Teori



Keterangan:

—————> : Garis pengaruh

3.2. Kerangka Konsep



3.3. Hipotesis

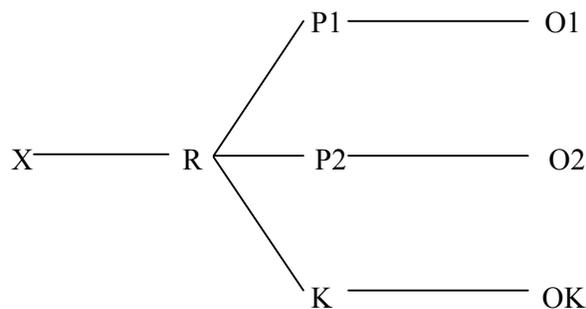
Hipotesis pada penelitian ini adalah:

- 1) Prosentase neutrofil lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan *Phyllanthus niruri L*.
- 2) Jumlah koloni bakteri limpa lebih rendah pada kelompok mencit yang diberi *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan *Phyllanthus niruri L*.
- 3) Gambaran histopatologi hepar menunjukkan derajat kerusakan yang lebih rendah pada kelompok mencit yang diberi *Phyllanthus niruri L* dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan *Phyllanthus niruri L*.

4. METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode quasi eksperimen di laboratorium dengan rancangan *the post test-only control group*.⁴⁷ Percobaan dilakukan dengan random sampling sederhana. Perlakuan berupa pemberian larutan ekstrak *Phyllanthus niruri L* (dari Laboraturum Pengujian Mutu Bahan Baku Obat Alam dan Agro Industri Undip) pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan bakteri *Salmonella typhimurium* (dari Bagian Mikrobiologi FK Undip). Parameter pengukuran variabel berupa prosentase neutrofil⁴⁰, jumlah koloni bakteri limpa²⁷ dan gambaran histopatologi hepar.^{17,48}



Keterangan:

X→R: Masa adaptasi selama 1 minggu

R : Randomisasi

P1 : Perlakuan-1, mencit diberi pakan standar, diinfeksi *Salmonella typhimurium* 10^4 , dan diberi larutan *Phyllanthus niruri L* dengan

dosis 3 x 0,125 mg/hr.

- P2 : Perlakuan-2, mencit diberi pakan standar, diinfeksi *Salmonella typhimurium* 10⁴, dan diberi larutan *Phyllanthus niruri L* dengan dosis 3 x 0,25 mg/hr.
- K : Kontrol, mencit mendapat pakan standar dan diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* tetapi tidak diberi *Phyllanthus niruri L*.
- O1 : Observasi terhadap perlakuan-1
- O2 : Observasi terhadap perlakuan-2
- OK : Observasi terhadap kontrol

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 *Phyllanthus niruri L* sebagai imunomodulator pada orang dewasa adalah 3 x 50 mg/hr sehingga didapatkan dosis untuk mencit 3 x 0,13 mg/hr. Untuk mengetahui efek terbaik dibuat rentang dosis yaitu 3 x 0,125 mg/hr dan 3 x 0,25 mg/hr. Pembuatan ekstrak menggunakan metode *Soxlet* seperti yang terlihat pada lampiran 10.

4.2. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* 10⁴.

4.3. Sampel

4.3.1. Cara Pengambilan Sampel

Kriteria inklusi sampel meliputi:

- a) Galur murni,
- b) Jenis kelamin jantan,
- c) Umur 8-10 minggu,
- d) Berat badan 20-30 gram,
- e) Sehat, sebelum diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

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

4.3.2. Jumlah Sampel

Jumlah sampel ditetapkan 6 ekor masing-masing kelompok atau jumlah keseluruhan 18 ekor. Penetapan jumlah sampel yang relatif kecil ini didasarkan atas pertimbangan *ethical clearance* karena semua sampel akan diterminasi (dibunuh).

4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1. Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *Phyllanthus niruri L.*

Sedangkan variabel tergantung penelitian adalah:

- 1) Prosentase neutrofil.
- 2) Jumlah koloni bakteri limpa.
- 3) Gambaran histopatologi hepar.

4.4.2. Definisi Operasional

Definisi operasional variabel penelitian:

- 1) *Phyllanthus niruri L* adalah larutan ekstrak etanol *Phyllanthus niruri L* yang diberikan kepada kelompok perlakuan mencit Balb/C (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) melalui sonde lambung dengan dosis 3x 0,125 mg/hr dan 3x 0,25 mg/hr. Skala yang dipakai adalah skala numerik dengan satuan mg.
- 2) Prosentase neutrofil adalah prosentase jumlah neutrofil terhadap jumlah leukosit dalam darah mencit Balb/C (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) yang dihitung pada sediaan darah tepi dengan pewarnaan Giemsa menggunakan mikroskop cahaya di laboratorium klinik. Skala yang dipakai adalah skala numerik dengan satuan %.
- 3) Jumlah koloni bakteri limpa adalah jumlah koloni bakteri *Salmonella* dari limpa mencit Balb/C (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) yang dihancurkan dan diencerkan serta dibiakkan pada medium *Salmonella-Sigella Agar*. Skala yang dipakai adalah skala numerik dengan satuan CFU/gram.
- 4) Gambaran histopatologi hepar adalah gambaran kerusakan jaringan hepar mencit Balb/C (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) dalam bentuk sediaan jaringan yang dicat dengan pengecatan HE dan diskor menggunakan metode *Knodell score* (lampiran 1.) oleh Ahli Patologi Anatomi. Skala yang digunakan adalah skala numerik.

4.5. Bahan dan Reagen Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan:

- 1) Pakan ternak 511
- 2) Bakteri *Salmonella typhimurium*
- 3) Larutan ekstrak *Phyllanthus Niruri L*
- 4) Darah, hepar dan limpa mencit
- 5) Alkohol 70%
- 6) Formalin buffer
- 7) Bahan untuk *processing* jaringan (alkohol 75%, 85%, 95%, 99%, 100%; Xylol; paraffin; Albumin dan Glisin)
- 8) Bahan untuk pengecatan HE (Xylol; alkohol 100%, 95%, 90%, 85%, 75%; Hematoxillin Mayer; Eosin; air mengalir, dan Canada balsam)
- 9) NaCl fisiologis steril
- 10) Aquadest steril
- 11) *Salmonella-Shigella Agar*.

4.6. Alat/instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang dibutuhkan:

- 1) Kandang hewan
- 2) Sonde lambung
- 3) Sduit 1cc dan 10 cc steril
- 4) Kaca objek dan kaca penutup
- 5) Gunting, pinset, dan klem
- 6) Timbangan elektrik
- 7) Mortir
- 8) Gelas ukur

- 9) Tabung reaksi
- 10) *Laminar flow hood*
- 11) *Vortex genie 2*
- 12) Cawan petri
- 13) Inkubator
- 14) Cetakan blok paraffin dan Pisau pemotong jaringan (mikrotom)
- 15) Mikroskop cahaya dan kamera.

4.7. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Mikrobiologi, Patologi Klinik dan Patologi Anatomi FK Undip pada bulan April 2007.

4.8. Prosedur Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- 2) Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 18 ekor mencit dibagi dalam 3 kelompok.
- 3) Kelompok P1 dan P2 diberi pakan standar dan larutan *Phyllanthus niruri L* dengan dosis yang sudah ditetapkan selama 9 hari, Dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-2 dan pengambilan darah pada hari ke-3. Pada hari ke-10 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan histopatologi hepar dan hitung koloni bakteri limpa.

- 4) Kelompok K diberi pakan standar selama 9 hari, dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-2 dan pengambilan darah pada hari ke-3. Pada hari ke-10 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan histopatologi hepar dan hitung koloni bakteri limpa.

4.9. Prosedur Pemeriksaan

4.9.1. Prosedur Pengambilan Preparat

Cara pengambilan bahan pemeriksaan:

- 1) Pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan neutrofil dilakukan pada hari ke-3 pada vena lateralis ekor dengan memotong ujungnya.⁴¹
- 2) Pada hari ke-10 mencit dibunuh dengan dislokasi leher.
- 3) Mencit diterlentangkan dan seluruh permukaan ventral disemprot alkohol 70%.
- 4) Di buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada bagian medial abdomen, kulit dirobek menggunakan pinset ke arah kepala dan ekor sehingga tampak peritoneum. Peritoneum dibasahi menggunakan alkohol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu.
- 5) Peritoneum dibuka, hepar dan limpa diambil dengan teknik aseptik untuk dilakukan pemeriksaan histologi hepar dan hitung koloni bakteri limpa.

4.9.2. Prosedur Pemeriksaan Neutrofil

Langkah-langkah dalam pemeriksaan neutrofil:

- 1) Teteskan darah pada garis tengah kaca objek kira-kira 2 cm dari ujung.

- 2) Dengan tangan kanan letakkan kaca objek lain disebelah kiri tetesan dan gerakkan ke kanan sampai menyentuh tetes darah.
- 3) Darah akan menyebar pada sisi penggeser.
- 4) Geserkan kaca ke kiri dengan memegangnya miring 45 derajat.
- 5) Biarkan kering di udara dan beri label.
- 6) Buat pewarnaan Giemsa.
- 7) Sediaan dibaca dibawah mikroskop cahaya.

4.9.3. Prosedur Pemeriksaan Hitung Koloni Bakteri

Langkah-langkah dalam pemeriksaan hitung koloni bakteri:

- 1) Limpa diambil dengan menggunakan teknik aseptik kemudian dilakukan penimbangan.
- 2) Jaringan limpa yang didapat dihancurkan dengan mortir dan ditambahkan NaCl fisiologis steril 4,5 ml.
- 3) Isi 6 tabung reaksi dengan NaCl 4,5 ml.
- 4) Masukkan 0,5 ml larutan dari mortir pada tabung I dan dilakukan homogenisasi dengan menggunakan vortex.
- 5) Diambil 0,5 ml larutan dari tabung I kemudian dimasukkan ke tabung II dan seterusnya dilakukan sampai tabung VI sehingga telah dilakukan pengenceran 1:10 pada masing-masing pengenceran. Pada tabung terakhir larutan yang diambil kemudian dibuang.
- 6) Sampel dari masing-masing tabung sebanyak 0,1 ml diinokulasi pada *Salmonella-Sigella Agar* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

- 7) Hitung jumlah koloni pada masing-masing plate pengenceran yang berisi 30-300 CFU.
- 8) Hitung CFU/gram jaringan dengan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah CFU X Pengenceran X 10}}{\text{Berat jaringan (gram)}}$$

4.9.4. Pemeriksaan Histopatologi Hepar

Langkah-langkah dalam pemeriksaan histopatologi meliputi *processing* jaringan, pengecatan HE, dan interpretasi hasil. Prosedur dalam *processing* jaringan adalah sebagai berikut:

- 1) Hepar yang diambil dengan teknik aseptik dimasukkan ke dalam cairan fiksasi formalin buffer selama 24 – 48 jam.
- 2) Setelah difiksasi dengan formalin buffer selama 24 – 48 jam, dilakukan dehidrasi dengan alkohol seri: 75%, 85%, 95%, 99%, dan 100% masing-masing 1,5 jam.
- 3) Kemudian dilakukan *clearing* menggunakan Xylol selama 1,5 jam.
- 4) Setelah itu dilakukan *impregnating* dengan paraffin dan *embedding* (pembuatan blok).
- 5) Langkah selanjutnya adalah pemotongan jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-7 μm , pengecatan HE dan *mounting* dengan kaca penutup.

Adapun langkah-langkah dalam pengecatan HE adalah sebagai berikut:

- 1) Potongan jaringan yang sudah ditempelkan pada kaca objek (diberi albumin dan glisin) diberi etiket/label.

- 2) Masukkan ke dalam Xylol I, II, dan III masing-masing 1 menit.
- 3) Masukkan ke dalam alkohol seri 100%, 99%, 95%, 85%, dan 75% masing-masing 2 detik.
- 4) Bilas dengan air mengalir.
- 5) Celupkan ke dalam Hematoxillin Mayer selama 5 – 10 menit.
- 6) Bilas dengan air mengalir selama 5 – 10 menit.
- 7) Celupkan ke dalam Eosin selama 1 – 2 menit kemudian bilas dengan air.
- 8) Masukkan ke dalam alkohol seri 75%, 85%, 90%, 100%, 100%, 100% sekedarnya saja.
- 9) Masukkan ke dalam Xylol I, II, III, IV, dan V sekedarnya saja.
- 10) Tutup dengan kaca penutup dengan diberi Canada balsam.

Sedangkan untuk interpretasi hasil dilakukan oleh Ahli Patologi Anatomi dengan menggunakan mikroskop cahaya. Hasil diskor menggunakan metode *Knodell score*. Tabel penilaian *Knodell score* dapat dilihat pada lampiran 1.

4.10. Analisis Data

Terhadap data yang terkumpul dilakukan *editing*, *coding* dan *entry* dalam file komputer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS. Analisis deskriptif menampilkan nilai terendah, nilai tertinggi, mean, dan simpangan baku. Hasil dibuat dalam bentuk tabel dan grafik box-plot. Untuk uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Karena data normal maka digunakan statistik parametrik dengan uji *One way ANOVA* untuk uji hipotesisnya, dilanjutkan dengan *Post Hoc test (LSD)*.^{49,50}

5. HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian meliputi prosentase neutrofil, jumlah koloni bakteri limpa, dan gambaran histopatologi hepar. Sedangkan uji statistik yang digunakan adalah statistik parametrik karena berdasarkan uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* diketahui bahwa seluruh data pada masing-masing kelompok dinyatakan berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$.

5.1. Jumlah Neutrofil

Gambaran umum hasil penelitian tentang jumlah neutrofil dan hasil analisis statistik menggunakan uji *Oneway ANOVA* dapat dilihat pada tabel 1. sebagai berikut:

Tabel 1.
Perbedaan Prosentase Neutrofil

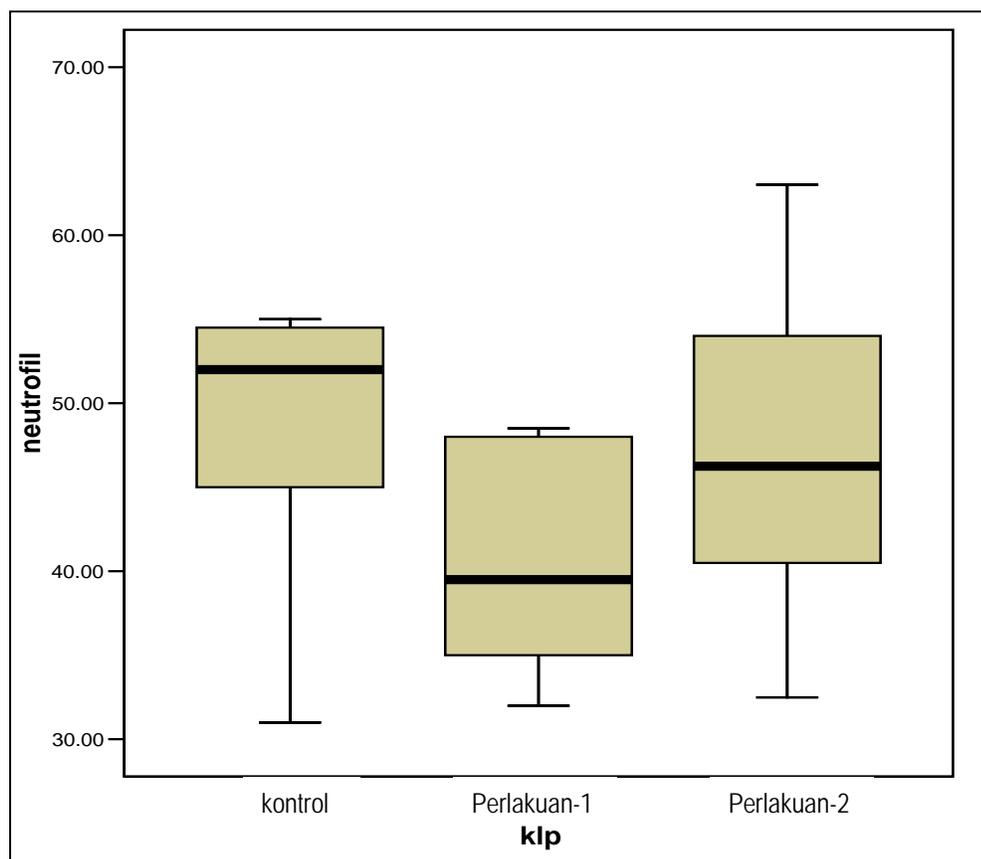
	Kontrol (%)	Perlakuan-1 (%)	Perlakuan-2 (%)	Nilai p*)
Prosentase Neutrofil				0,287
- Minimum	31	32	33	
- Maksimum	55	49	63	
- Mean	48,33	40,5	47,33	
- SD	9,27	6,83	10,4	

*) Uji *Oneway ANOVA*

Dari tabel 1. terlihat bahwa pada kelompok kontrol nilai terendah 31 dan nilai tertinggi 55 dengan rata-rata 48,33 dan standar deviasi 9,27. Pada kelompok perlakuan-1 nilai terendah 32 dan nilai tertinggi 49 dengan rata-rata 40,5 dan standar deviasi 6,83. Pada kelompok perlakuan-2 nilai terendah 33 dan nilai tertinggi 63 dengan rata-rata 47,33 dan standar deviasi 10,4. Dengan demikian

selisih rata-rata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 adalah 7,83, antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 adalah 1, dan antara kelompok perlakuan-1 dengan -2 adalah 6,83.

Berdasarkan data tersebut dapat dibuat diagram *box-plot* seperti yang tampak pada gambar 1.



Gambar 1.
Diagram Box-plot Prosentase Neutrofil

Dari tabel 1. juga diketahui bahwa hasil uji statistik rata-rata prosentase neutrofil antara kelompok kontrol dengan perlakuan-1 dan -2 menghasilkan nilai p sebesar 0,287 ($> 0,05$). Ini berarti hipotesis nol diterima

sehingga diambil kesimpulan bahwa tidak ada perbedaan rata-rata prosentase neutrofil antar kelompok. Oleh karena itu tidak dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc test (LSD)* untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok.

5.2. Koloni Bakteri Limpa

Gambaran umum hasil penelitian tentang jumlah koloni bakteri limpa dan hasil analisis statistik menggunakan uji *Oneway ANOVA* dapat dilihat pada tabel 2. sebagai berikut:

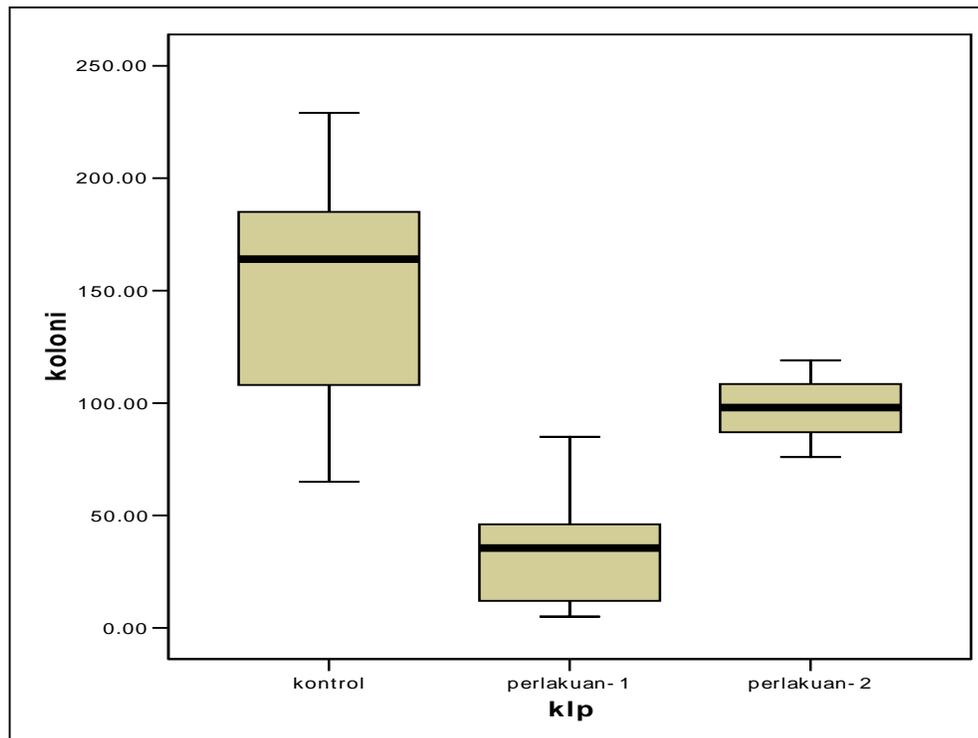
Tabel 2.
Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri Limpa

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

*) Uji *Oneway ANOVA*

Dari tabel 2. terlihat bahwa pada kelompok kontrol nilai terendah 65 dan nilai tertinggi 229 dengan rata-rata 152,5 dan standar deviasi 58,2. Pada kelompok perlakuan-1 nilai terendah 5 dan nilai tertinggi 85 dengan rata-rata 36,5 dan standar deviasi 28,56. Pada kelompok perlakuan-2 nilai terendah 76 dan nilai tertinggi 119 dengan rata-rata 97,67 dan standar deviasi 21,5. Dengan demikian selisih rata-rata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 adalah 116, antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 adalah 54,83, dan antara kelompok perlakuan-1 dengan -2 adalah 61,17.

Berdasarkan data yang ada dapat dibuat diagram *box-plot* seperti yang tampak pada gambar 2.



Gambar 2.
Diagram *Box-plot* Jumlah Koloni Bakteri Limpa

Untuk rata-rata jumlah koloni bakteri limpa, uji statistik dengan uji *Oneway ANOVA* menunjukkan nilai p sebesar $0,002 (< 0,05)$. Ini berarti hipotesis nol ditolak sehingga diambil kesimpulan bahwa ada perbedaan rata-rata jumlah koloni bakteri limpa antar kelompok. Oleh karena itu dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc test (LSD)* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

Hasil *multiple comparisons* dengan *Post Hoc test (LSD)* dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3.
Hasil *Post Hoc test (LSD)* Jumlah Koloni Bakteri Limpa

N=15	Kontrol	Perlakuan-1	Perlakuan-2
Kontrol	-	0,001	0,095
Perlakuan 1	0,001	-	0,066
Perlakuan 2	0,095	0,066	-

Pada tabel 3. terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 terdapat perbedaan yang sangat signifikan dengan nilai p sebesar 0,001 ($< 0,05$). Sementara itu antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p sebesar 0,095 ($> 0,05$). Begitu juga antara kelompok perlakuan-1 dengan -2, tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p sebesar 0,066 ($> 0,05$). Oleh karena itu disimpulkan bahwa ada perbedaan rata-rata jumlah koloni bakteri limpa antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, di mana nilai pada kelompok yang diberi *Phyllanthus niruri L* lebih rendah daripada yang tidak.

5.3. Gambaran Histopatologi Hepar

Gambaran umum hasil penelitian tentang gambaran histopatologi hepar dan hasil analisis statistik menggunakan uji *Oneway ANOVA* dapat dilihat pada tabel 4.

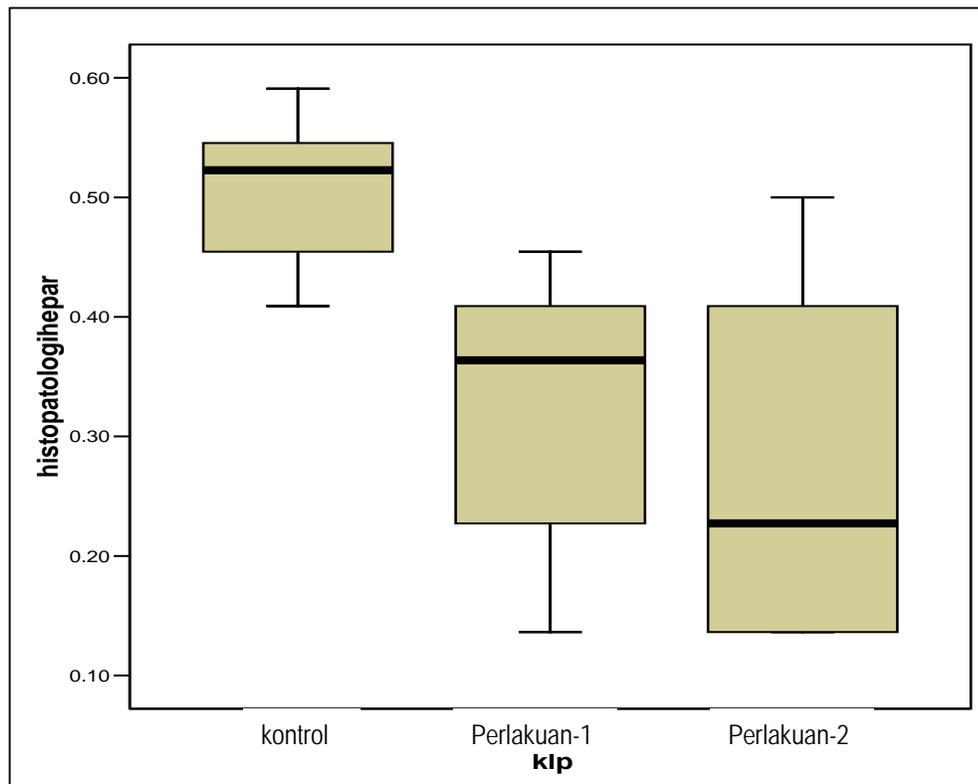
Tabel 4.
Gambaran dan Analisis Perbedaan Skor Histopatologi Hepar

	Kontrol	Perlakuan-1	Perlakuan-2	Nilai p*)
Jumlah Neutrofil				0,017
- Minimum	0,41	0,14	0,14	
- Maksimum	0,59	0,45	0,50	
- Mean	0,51	0,32	0,28	
- SD	0,67	0,12	0,17	

*) Uji *Oneway ANOVA*

Di dalam tabel 4. terlihat bahwa pada kelompok kontrol nilai terendah 0,41 dan nilai tertinggi 0,59 dengan rata-rata 0,51 dan standar deviasi 0,07. Pada kelompok perlakuan-1 nilai terendah 0,14 dan nilai tertinggi 0,45 dengan rata-rata 0,32 dan standar deviasi 0,12. Pada kelompok perlakuan-2 nilai terendah 0,14 dan nilai tertinggi 0,50 dengan rata-rata 0,28 dan standar deviasi 0,17. Dengan demikian selisih rata-rata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 adalah 0,19, antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 adalah 0,23, dan antara kelompok perlakuan-1 dengan -2 adalah 0,04.

Berdasarkan data tersebut dapat dibuat diagram *box-plot* seperti yang tampak pada gambar 3.



Gambar 3.
Diagram *Box-plot* Gambaran Histopatologi Hepar

Uji statistik terhadap gambaran histopatologi hepar menggunakan uji *Oneway ANOVA* menunjukkan nilai p sebesar 0,017 ($< 0,05$). Ini berarti hipotesis nol ditolak sehingga diambil kesimpulan bahwa ada perbedaan gambaran histopatologi hepar antar kelompok. Oleh karena itu dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc test (LSD)* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

Hasil *multiple comparisons* dengan *Post Hoc test (LSD)* dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5.
Hasil *Post Hoc test (LSD)* Gambaran Histopatologi Hepar

N=17	Kontrol	Perlakuan-1	Perlakuan-2
Kontrol	-	0,022	0,008
Perlakuan 1	0,022	-	0,561
Perlakuan 2	0,008	0,561	-

Pada tabel 4. terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p sebesar 0,022 ($< 0,05$). Sementara itu antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p sebesar 0,008 ($< 0,05$). Sedangkan antara kelompok perlakuan-1 dan -2 tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p sebesar 0,561 ($> 0,05$). Oleh karena itu disimpulkan bahwa ada perbedaan rata-rata gambaran histopatologi hepar antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, di mana nilai pada kelompok yang diberi *Phyllanthus niruri L* lebih rendah daripada yang tidak.

6. PEMBAHASAN

Sesuai dengan hasil penelitian maka sistematika pembahasan dilakukan pada masing-masing variabel meliputi prosentase neutrofil, jumlah koloni bakteri limpa dan gambaran histopatologi hepar.

6.1. Prosentase Neutrofil

Peran neutrofil untuk melawan infeksi *Salmonella typhimurium* terutama diperlukan pada fase ke-2, yaitu mulai hari I sampai III,⁵¹ di mana LPS dari *Salmonella typhimurium* akan mengaktivasi neutrofil, baik secara langsung maupun melalui aktifitas komplemen.⁵² Interaksi antara *Salmonella typhimurium* dan sel host akan memprovokasi dikeluarkannya IL-8 dan molekul proinflamasi lainnya. Sekresi IL-8 diinduksi NF- κ B yang diperantarai oleh penarikan dan peningkatan Ca^{2+} intrasel.¹⁹ 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.^{1,19} Sebagai akibatnya akan terjadi peningkatan neutrofil dalam darah (neutrofilia).

Untuk melakukan perannya, neutrofil harus memiliki potensi yang kuat dalam jumlah, kemotaksis, dan fagositosis.⁴ Potensi neutrofil tersebut dapat ditingkatkan dengan pemberian imunomodulator seperti *Phyllanthus niruri L.* Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa *Phyllanthus niruri L* mampu meningkatkan kemotaksis neutrofil⁴², yang pada hakekatnya akan mempengaruhi jumlah neutrofil dan kecepatannya dalam mencapai area radang sehingga meningkatkan efektifitas dalam mengeliminasi bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari sampel darah yang diambil pada 24 jam setelah inokulasi bakteri terjadi neutrofilia pada semua kelompok baik kontrol maupun perlakuan dengan rata-rata 48,33 % untuk kelompok kontrol, 40,50 % untuk kelompok perlakuan-1 (dosis 3 x 0,125), dan 47,33 % untuk kelompok perlakuan-2 (dosis 3 x 0,25), di mana nilai normal pada mencit adalah 12 – 30 %.⁴¹ Meskipun demikian, tidak ditemukan adanya perbedaan prosentase neutrofil antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,287$ ($>0,05$). Oleh karena itu diambil kesimpulan bahwa pemberian *Phyllanthus niruri L* tidak meningkatkan prosentase neutrofil. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya: adanya efek antiinflamasi *Phyllanthus niruri L*, waktu pengambilan sampel darah, dan jenis pemeriksaan laboratorium.

Phyllanthus niruri L merupakan imunomodulator yang dapat menstimulasi respon imun tetapi sebaliknya juga bisa meregulasi respon imun yang berlebihan.⁵ Banyak kandungan biologi maupun kimia yang terdapat pada *Phyllanthus niruri L*^{6,20,21} dan beberapa diantaranya justru mempunyai efek antiinflamasi. *Phyllanthus* menunjukkan kemampuan menghambat produksi NF κ B secara *in vitro*. NF κ B sangat dibutuhkan untuk menginduksi IL-8 sebagai mediator utama bagi neutrofil.^{1,19} *Phyllanthus* juga dapat menghambat induksi IL-1 β dan IFN γ pada *whole blood* serta reduksi TNF α secara *in vivo*.⁷ IL-1 β , IFN γ , dan TNF α , memiliki peran penting dalam proses radang akut termasuk diantaranya mengaktivasi neutrofil.¹

Waktu pengambilan darah juga dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan. Sebagaimana diketahui, *Phyllanthus niruri L* memiliki kemampuan meningkatkan kemotaksis neutrofil^{5,20} yang berarti meningkatkan kecepatan aktivasinya. Dengan demikian perbedaan prosentase neutrofil seharusnya akan terlihat jelas pada awal aktivasi, di mana neutrofil yang beredar dalam darah akan lebih cepat meningkat bila kemotaksis meningkat. Pada penelitian ini darah diambil 24 jam setelah inokulasi bakteri dan hampir semua neutrofil pada sampel sudah meningkat sehingga mengalami kesulitan untuk membedakan mana yang lebih dulu meningkat dan mana yang meningkat kemudian. Hal ini dikarenakan bakteri *Salmonella typhimurium* juga menginduksi peningkatan neutrofil.¹⁹

Selain itu hasil penelitian juga dipengaruhi oleh keterbatasan dalam pemeriksaan laboratorium. Metode penghitungan neutrofil pada penelitian ini menggunakan hitung darah tepi dengan tanpa mengetahui jumlah leukosit secara keseluruhan. Peningkatan yang terjadi merupakan peningkatan semu karena prosentase jumlah neutrofil pada hitung jenis leukosit tidak menggambarkan keseluruhan jumlah neutrofil dalam darah tetapi dipengaruhi perubahan jenis leukosit yang lain.⁴ Hal ini dikarenakan selain meningkatkan kemotaksis neutrofil, *Phyllanthus niruri L* juga meningkatkan kemotaksis monosit/makrofag dan proliferasi limfosit.^{5,20} Terlebih lagi mayoritas leukosit pada mencit didominasi sel limfosit (55 – 85 %), berbeda dengan leukosit manusia yang didominasi neutrofil.⁴¹ Kenyataan ini menjelaskan bahwa peningkatan kemotaksis neutrofil tidak serta merta meningkatkan prosentasenya sehingga diperlukan penelitian dengan pemeriksaan yang lebih spesifik untuk kemotaksis.

6.2. Koloni Bakteri Limpa

Pada fase II infeksi, bakteri akan masuk ke dalam sirkulasi untuk selanjutnya menginvasi limpa dan hepar.^{9,16} Akan tetapi mereka akan dihadang oleh sistem imun host. Beberapa saat setelah inokulasi secara intraperitoneal, 90% bakteri akan ditangkap dan dirusak oleh fagosit residen (makrofag).²⁵ Makrofag akan bekerjasama dengan sel NK dan neutrofil untuk mengeliminasi bakteri dengan bantuan mediator inflamasi seperti TNF α , IFN γ , IL-1, -6, -8, -12, -15, dan -18 seperti yang telah dijelaskan pada Bagian 2. Makrofag dan neutrofil mampu melakukan fagositosis dan mencerna serta merusak bakteri secara enzimatik dan *respiratory burst*.^{1,4} Sementara itu sel NK berperan untuk melisis sel yang terinfeksi sehingga bakteri yang hidup didalamnya dapat dieliminasi.¹ Selain imunitas alami, sistem pertahanan host terhadap Salmonella juga melibatkan imunitas didapat/adaptif yang meliputi sel T dengan beberapa subsetnya dan sel B dengan produksi antibodinya. Sel T diperlukan untuk ekspresi penuh imunitas terhadap Salmonella.^{29,31,35}

Semakin kuat sistem pertahanan/imunitas tubuh maka akan semakin memperkecil kesempatan bakteri untuk lolos dan mencapai organ limpa. Dalam hal ini *Phyllanthus niruri L* berfungsi untuk mengoptimalkan fungsi sistem imun. Pada penelitian terdahulu, *Phyllanthus niruri* terbukti mampu meningkatkan kemotaksis dan fagositosis makrofag.^{5,20} Ini penting mengingat Salmonella mampu menghambat fusi fago-lisosom sehingga dapat bertahan hidup dalam makrofag yang memfagositnya dan bahkan mampu melakukan multiplikasi di dalam fagosom yang tidak berfusi.^{29,30,31,32}

Selain itu *Phyllanthus niruri L* juga mampu meningkatkan kemotaksis neutrofil seperti telah dijelaskan diawal pembahasan dan meningkatkan sitotoksik sel NK^{5,20}. Peran sel NK ini sangat dibutuhkan karena *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri intrasel yang mampu hidup dan berkembang biak di dalam sel dalam jangka waktu yang sangat lama.⁹ Sel NK akan menghancurkan sel yang terinfeksi seperti halnya CD-8 sehingga bakteri yang ada didalamnya dapat dieliminasi.¹ Tidak sebatas itu, *Phyllanthus niruri L* terbukti mampu meningkatkan sekresi TNF α , IFN γ , dan IL-4. *Phyllanthus niruri L* juga dapat meningkatkan proliferasi sel T dan produksi imunoglobulin M (IgM) serta imunoglobulin G (IgG).^{5,20,21,46}

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapatkan *Phyllanthus niruri L* dengan dosis 3 x 0,125 mg terdapat perbedaan yang sangat signifikan pada hitung koloni bakteri limpa dengan nilai $p=0,002$ ($< 0,05$). Hal ini karena adanya efek imunomodulator dari *Phyllanthus niruri L* yang dapat meningkatkan fungsi sistem imun untuk menghambat patogenesis infeksi Salmonella.^{5,20,21,46} Hasil penelitian ini juga membuktikan hipotesis yang menyebutkan bahwa jumlah koloni bakteri limpa lebih rendah pada kelompok yang mendapatkan *Phyllanthus niruri L* daripada kelompok yang tidak mendapatkan *Phyllanthus niruri L*. Oleh karena itu disimpulkan bahwa pemberian *Phyllanthus niruri L* mampu meminimalisasi jumlah bakteri yang menginvasi limpa.

Sementara itu pada kelompok-2 dengan dosis 3 x 0,25 mg tidak didapatkan perbedaan bermakna dari kelompok kontrol. Hal ini disebabkan karena

jumlah sampel yang sangat sedikit, yaitu hanya 3 ekor di mana 1 sampel dieksklusi karena mati dan 2 data dihilangkan karena sangat ekstrem. Hal ini didukung adanya bukti bahwa meskipun secara statistik tidak ada perbedaan, tetapi selisih rata-rata dengan kelompok kontrol cukup besar, yaitu 54,83. Selain itu juga tidak didapatkan adanya perbedaan antara kelompok perlakuan-1 (yang berbeda dari kelompok kontrol) dengan perlakuan-2 tersebut. Kenyataan lain adalah adanya perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-2 pada gambaran histopatologi hepar dengan jumlah sampel yang lebih banyak, di mana seharusnya berbanding lurus dengan jumlah koloni bakteri.

Terlepas dari apa yang telah disebutkan, hasil penelitian serupa juga terjadi pada penelitian tentang pengaruh ekstrak bawang putih terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Disebutkan bahwa kelompok dengan dosis ekstrak bawang putih 2 mg/hari mempunyai *survival rate* lebih besar dan jumlah koloni lebih rendah daripada kelompok dengan dosis yang lebih besar (4 mg/hari).⁵¹ Dengan demikian semakin tinggi dosis tidak selalu berarti semakin tinggi efek obat. Bahkan bisa muncul efek sebaliknya, seperti yang terjadi pada Aspirin sebagai obat penurun panas yang justru akan menyebabkan peningkatan panas tubuh pada dosis berlebih dan alkohol 70% sebagai antiseptik yang akan kehilangan efek antiseptiknya bila konsentrasi ditingkatkan.⁵³ Untuk membuktikan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan dosis bertingkat melalui pengukuran kadar sitokin proinflamasi maupun antiinflamasi.

6.3. Gambaran Histopatologi Hepar

Bakteri yang berhasil mencapai hepar akan menginfeksi sel hepar (hepatosit), bermultiplikasi di dalamnya dan bersembunyi dari kejaran sel fagosit.^{16,29} Keberadaan bakteri Salmonella akan mengakibatkan berbagai perubahan pada hepar. Perubahan ini terjadi akibat dari endotoksin Salmonella dan respon imun melawan bakteri yang dapat menyebabkan terjadinya jejas pada hepatosit di sekitar area radang.^{17,41} Gambaran degenerasi lemak disertai pembengkakan sel merupakan manifestasi pertama yang muncul. Hepar juga mengalami hyperemia, 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.¹⁷ Akan tampak pusat nekrosis kecil-kecil disertai banyak sel mononuklear.⁴¹

Besar kecilnya kerusakan hepar dipengaruhi oleh besar kecilnya jumlah bakteri yang menginvasi organ tersebut. Semakin banyak bakteri yang mencapai hepar akan semakin besar juga kerusakan yang terjadi. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kerusakan dari tingkat ringan sampai berat seperti yang tampak pada lampiran 5. Pada daerah periportal terjadi *piecemeal necrosis* dari tingkat ringan sampai tingkat berat dan bahkan sebagian disertai *bridging necrosis*. Pada daerah intralobular tampak degenerasi dan fokal nekrosis dari tingkat ringan sampai berat. Demikian juga dengan inflamasi portal, bervariasi dari ringan sampai berat. Akan tetapi pada semua sampel, baik kelompok kontrol

maupun perlakuan tidak tampak adanya fibrosis. Hal ini kemungkinan terjadi karena jejas bersifat reversibel dan fibrosis hanya terjadi pada radang kronis.⁵⁴

Hasil penelitian membuktikan bahwa *Phyllanthus niruri L* berperan dalam meminimalisasi kerusakan pada hepar. Hal ini dibuktikan dengan skor gambaran histopatologi yang berbeda secara signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dengan demikian hipotesis yang menyebutkan bahwa kerusakan hepar pada kelompok yang diberi *Phyllanthus niruri L* lebih rendah daripada kelompok yang tidak mendapatkan *Phyllanthus niruri L* dalam penelitian ini dapat dibuktikan. Hal tersebut sebagai bukti adanya manfaat pemberian *Phyllanthus niruri* sebagai imunomodulator dalam menghambat progresifitas/ patogenesis infeksi Salmonella.

Secara keseluruhan hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian terdahulu yang membuktikan manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* pada penderita TBC²⁰, ISPA^{5,7}, varisela⁵, hepatitis B⁴³, HIV⁴⁴, infeksi Stafilokokus⁴⁶, keganasan²¹, dan lain sebagainya. Selain itu juga mendukung bukti paraempiris terhadap penggunaan *Phyllanthus niruri L* secara tradisional, baik di dalam maupun di luar negeri dalam pengobatan berbagai macam penyakit, khususnya penyakit infeksi.^{43,44,45,46}

7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang ada dapat diambil kesimpulan bahwa ada manfaat pemberian *Phyllanthus niruri L* pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan uraian sebagai berikut:

- 1) Pemberian *Phyllanthus niruri L* tidak meningkatkan prosentase neutrofil mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*, dibuktikan dengan tidak adanya perbedaan rata-rata antara kelompok kontrol dengan perlakuan-1, dan perlakuan-2.
- 2) Pemberian *Phyllanthus niruri L* menurunkan jumlah koloni bakteri limpa mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*, dibuktikan dengan adanya perbedaan rata-rata koloni bakteri limpa antara kelompok kontrol dan perlakuan-1.
- 3) Pemberian *Phyllanthus niruri L* memperbaiki gambaran histopatologi hepar mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*, dibuktikan dengan adanya perbedaan rata-rata Skor HAI antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-1 dan perlakuan-2.

7.2. Saran

Dari kesimpulan tersebut perlu kiranya dilakukan penelitian lanjutan tentang berbagai manfaat *Phyllanthus niruri L* berupa:

- 1) Penelitian tentang manfaat *Phyllanthus niruri L* untuk berbagai penyakit infeksi yang lain dengan melibatkan berbagai macam pemeriksaan imunologi.

- 2) Penelitian tentang manfaat *Phyllanthus niruri L* sebagai adjuvan dalam pengobatan typhoid pada manusia.
- 3) Penelitian tentang faktor-faktor yang mempengaruhi efek imunomodulator *Phyllanthus niruri L*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, and Imboden JB. Medical immunology 10th ed. Singapore: McGraw-Hill. 2003.
2. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar ed-6. Jakarta: FKUI. 2004.
3. Kresno SB. Imunologi: diagnosis dan prosedur laboratorium. Jakarta: FKUI. 1996.
4. Widmann FK. Tinjauan klinis atas hasil pemeriksaan laboratorium ed-9. Jakarta: EGC. 1995.
5. Munasir Z. Manfaat pemberian ekstrak phyllanthus nururi sebagai imunostimulator pada penyakit infeksi anak. 2002. Available from: URL: <http://www.tnial.mil.id/cakrawala.php3>. 12/1/07
6. Elfahmi. Phytochemical and biosynthetic studies of Lignans, with a focus on Indonesian medicinal plants (dissertation). University of Groningen. 2006.
7. Stagg J. Phyllanthus. 2006. Available from: URL: <http://www.supplementnews.org/phyllanthus.html>. 17/6/06
8. 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;6:567-579.
9. Monack DM, Bouley DM, and Falkow S. Salmonella typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrpml^{+/+} Mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *JEM*. 2004;199:231-241.
10. Mastroeni P and Ménager N. Development of acquired immunity to Salmonella. *J Med Microbiol* 2003;52:453-459.
11. WHO. Drug-resistant Salmonella. Fact sheet N°139. 2005. Available from: URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>. 27/12/06
12. Qutaishat SS, et al. Transmission of Salmonella enterica serotype typhimurium DT104 to infants through mother's breast milk. *Pediatrics*. 2003;111:1442-1446.

13. Parry CM. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. In: Pietro Mastroeni, ed. *Salmonella infections: clinical, immunological and molecular aspects*. UK and New York: Cambridge University Press. 2006.
14. 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;73:3367-3374.
15. Zhang S, et al. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* 2003;71:1-12
16. 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: 6808-6819.
17. 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 Indones.* 2005;40:36-44.
18. Tumbelaka AR. Tata laksana demam tifoid pada anak. *Pediatrics Update* 2003;37-45.
19. Gewirtz AT, et al. *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca²⁺-mediated activation of the NFκ-B pathway. *J Clin Invest.* 2000;105:79-92.
20. Radityawan D. Pengaruh *Phyllanthus niruri* sebagai imunomodulator terhadap kadar IFN-γ pada penderita tuberkulosis paru. *Dexa Media.* 2005;18:94-96.
21. Chodidjah. Pengaruh pemberian ekstrak (*Phyllanthus niruri* L) pada sel mononuklear terhadap viabilitas sel adenokarsinoma mama mencit C3H, penelitian invitro (tesis). Semarang: Universitas Diponegoro. 2003.
22. 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;32:91-95.

23. 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;12:211-212.
24. 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.
25. Lehner MD. Immunomodulation by endotoxin tolerance in murine models of inflammation and bacterial infection (dissertation). University of Konstanz. 2001.
26. Giannella RA. *Salmonella*. In: Baron S, ed. on-line version of the *Medical Microbiology* textbook. 2004. Available from URL: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.htm>. 21/6/06
27. 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 Indones*. 2004;39:195-202.
28. Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsolis RM, and Bäumlér 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
29. Cummings et al. FliC-Specific CD4+ T cell responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. *The Journal of Immunology*. 2005;174:7929-7938.
30. Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H, et al. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma Interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun*. 1999;67:478-483.
31. Elhogy A and Bost KL. Limited Interleukin-18 response in *Salmonella*-infected murine macrophages and in *Salmonella*-infected mice. *Infect. Immun*. 1999;67:5021-5026.

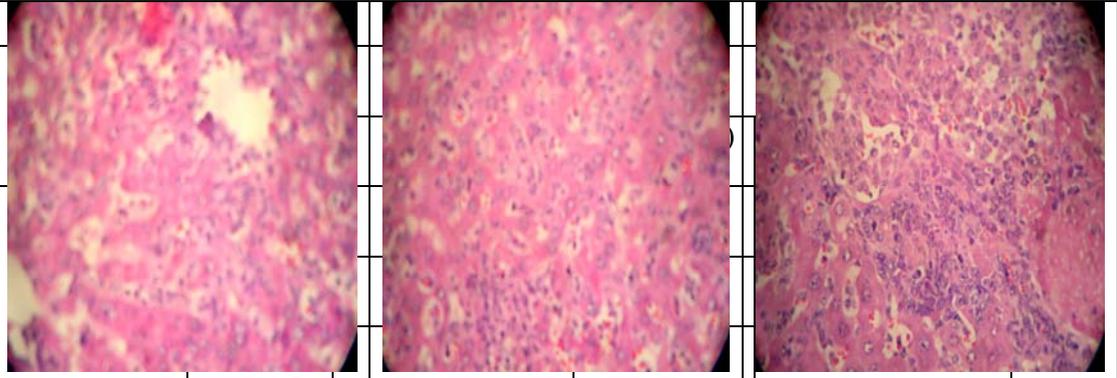
32. Wilson JW, Ramamurthy R, Porwollik S, McClelland M, Hammond T, Allen P, et al. Microarray analysis identifies Salmonella genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. PNAS. 2002;99: 13807-13812.
33. Haraga A and Miller SI. A Salmonella enterica serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF- κ B-dependent gene expression. Infect. Immun. 2003;71:4052-4058.
34. 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;146:3217-3226.
35. Van der Velden AWM, Copass MK, and Starnbach MN. Salmonella inhibit T cell proliferation by a direct, contact-dependent immunosuppressive effect. PNAS. 2005;102:17769-17774.
36. Barrali RA. Salmonella Infection. 2006. Available from: URL: <http://www.emedicine.com/emerg/topic515.htm#section.26/12/06>
37. Criss AK, Silva M, Casanova JE, and McCormick BA. Regulation of Salmonella-induced neutrophil transmigration by epithelial ADP-ribosylation factor 6. J. Biol. Chem. 2001;276:48431-48439.
38. 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
39. 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;10:426-430.
40. Gandasoebrata R. Penuntun laboratorium Klinik, cet-9. Jakarta: Dian Rakyat. 1999.
41. Smith JB and Mangkoewidjojo S. Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis. Jakarta: UI-Press. 1988.

42. 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.
43. Taylor L. Database File for: Chanca Piedra (*Phyllanthus niruri*). 2006. Available from: URL: <http://www.rain-tree.com/index.html>. 25/1/07
44. Naik AD and Juvekar AR. Effects of alkaloidal extract of *Phyllanthus niruri* on HIV replication. *Indian J Med Sci*. 2003;57: 387-393.
45. Oudhia P. Bhuiaonla (*Phyllanthus niruri*): A useful medicinal weed. 2002. Available from: URL: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/default.html>. 17/6/06
46. Praseno, Nuryastuti T, dan Mustafa M. Perbandingan efikasi infusa meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan kotromoksazol pada pengobatan infeksi kulit oleh *Staphylococcus aureus*. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 2001;33:89-93.
47. Danim S. Riset Keperawatan: sejarah dan metodologi. Jakarta: EGC. 2003.
48. Franciscus A, ed. Grading and staging a liver biopsy. HCSP Version 2.0. 2006. Available from: URL: <http://www.hcvadvocate.org>. 5/1/07
49. Sugiyono, Wibowo E. Statistika penelitian dan aplikasinya dengan SPSS 10.0 for Windows. Bandung: Alfabeta. 2002.
50. Budiarto E. Biostatistika untuk kedokteran dan kesehatan masyarakat. Jakarta: EGC. 2002.
51. Purwoko Y. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* (tesis). Semarang. Universitas Diponegoro. 2003.
52. Nelwan R.H.H. Patofisiologi dan deteksi dini sepsis. *Acta Medica Indonesiana*. 2003;xxxv.15-18.
53. Ganiswarna SG, Setiabudy R, Suyatna FD, Purwastyastuti, Nafrialdi, ed. *Farmakologi dan terapi ed-4*. Jakarta: FKUI. 1995.
54. Lankford LB, Coe SD. Use of *Phyllanthus* for treating chronic inflammatory and fibrotic processes. *PatentStorm*. 2003;560557.

Lampiran 1.
Tabel HAI dengan *Knodell score*

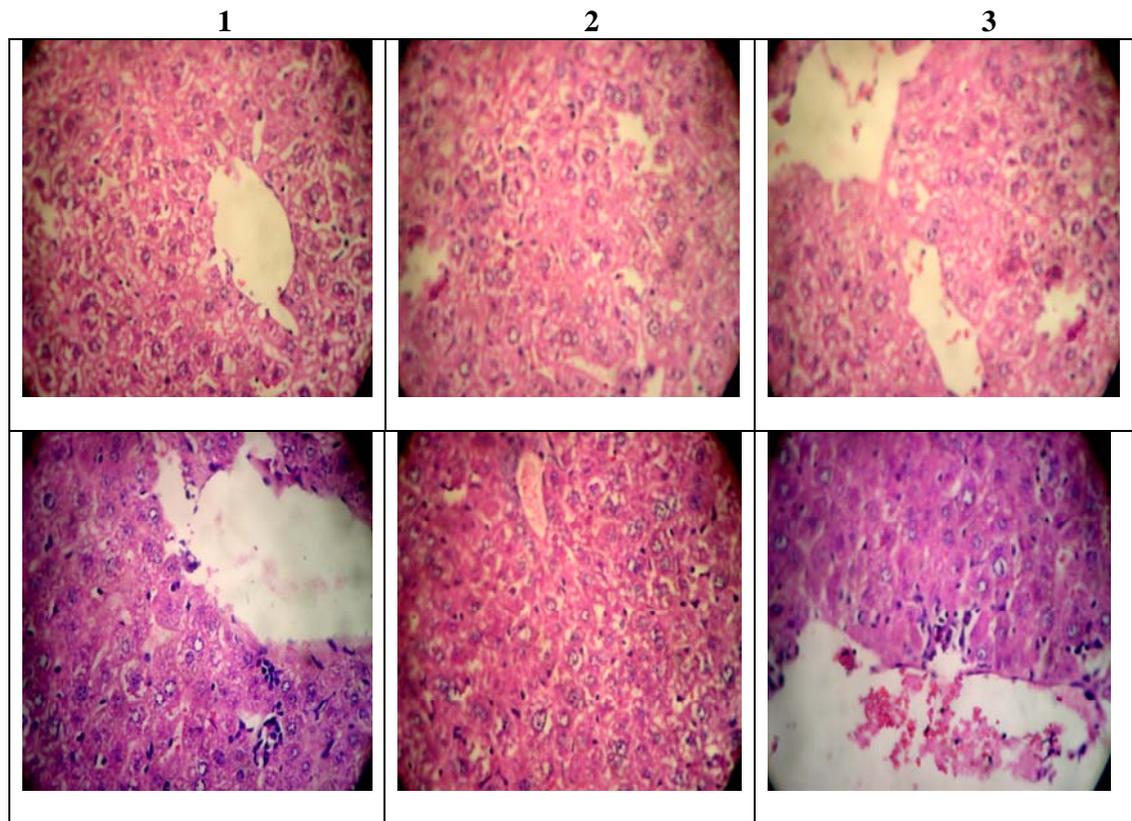
HISTOLOGY ACTIVITY INDEX (HAI - Knodell Score)							
Periportal ± Bridging Necrosis	Score	Intralobular Degeneration and Focal Necrosis	Score	Portal Inflammation	Score	Fibrosis	Score
None	0	None	0	No portal inflammation	0	No fibrosis	0
Mild piecemeal necrosis	1	Mild (acidophilic bodies, ballooning degeneration and/or scattered foci of hepatocellular necrosis in 1/3 of lobules or nodules)	1	Mild (sprinkling of inflammatory cells in <1/3 of portal tracts)	1	Fibrous portal expansion	1
Moderate piecemeal necrosis (involves <50% of the circumference of most portal tracts)	3	Moderate (involvement of 1/3-2/3 of lobules or nodules)	3	Moderate (increased inflammatory cells in 1/3-2/3 of portal tracts)	3	Bridging Fibrosis (portal-portal or portal-central linkage)	3
Marked piecemeal necrosis (involves >50% of the circumference of most portal tracts)	4	Marked (involvement of >2/3 of lobules or nodules)	4	Marked (dense packing of inflammatory cells in >2/3 of portal tracts)	4	Cirrhosis	4
Moderate piecemeal necrosis <i>plus</i> bridging necrosis	5						
Marked piecemeal necrosis <i>plus</i> bridging necrosis	6						
Multilobular necrosis	10						
Total HAI (Knodell Score) = __/22							

Lampiran 3.

A					
		4	55	172	0,45
		5	55	108	0,41
B	II	6	53	185	0,55
		1	40	46.	0,23
		2	39	40	0,41
		3	32	12	0,41
		4	49	31	0,14
		5	48	85	0,32
C	III	6	35	5	0,45
		1	54	185	0,23
		2	41	76	0,50
		3	45	98	0,41
		4	63	119	0,14
		5	33	0	0,14
		6	48	-	.

Rekapitulasi Hasil Pemeriksaan Laboratorium

Lampiran 5.
Gambaran Histopatologi Hepar



Keterangan:

A: Kelompok Kontrol dengan skor 13/22, tampak nekrosis periportal sedang disertai *bridging necrosis* (1), Intralobular degeneration dan focal necrosis $> 2/3$ lobulus (2), dan Portal inflammation $> 2/3$ bagian (3) tetapi tidak tampak jaringan fibrosis;

B: Kelompok P1 (dosis 3 x 0,125 mg) dengan skor 3/22, tampak piecemeal necrosis ringan (1), Intralobular degeneration dan focal necrosis $< 2/3$ lobulus (2), dan Portal inflammation ringan (3);

C: Kelompok P2 (dosis 3 x 0,25 mg) dengan skor 3/22, tampak nekrosis periportal ringan tanpa disertai *bridging necrosis* (1), Intralobular degeneration dan focal necrosis ringan (2), dan Portal inflammation $< 2/3$ bagian (3) serta tak tampak jaringan fibrosis.

Lampiran 6.
Out Put SPSS (Statistik Deskriptif Neutrofil)

Descriptives

	klp		Statistic	Std. Error
neutrofil	Kontrol	Mean	48.2500	3.75444
		95% Lower Bound	38.5989	
		Confidence Upper Bound		
		Interval for		
		Mean	57.9011	
		5% Trimmed Mean	48.8333	
		Median	52.0000	
		Variance	84.575	
		Std. Deviation	9.19647	
		Minimum	31.00	
		Maximum	55.00	
		Range	24.00	
		Interquartile Range	13.13	
		Skewness	-1.731	.845
		Kurtosis	2.834	1.741
	Perlakuan-1	Mean	40.4167	2.73988
		95% Lower Bound	33.3736	
		Confidence Upper Bound		
		Interval for		
		Mean	47.4598	
		5% Trimmed Mean	40.4352	
		Median	39.5000	
		Variance	45.042	
		Std. Deviation	6.71131	
		Minimum	32.00	
		Maximum	48.50	
		Range	16.50	
		Interquartile Range	13.88	
		Skewness	.205	.845
		Kurtosis	-1.606	1.741
	Perlakuan-2	Mean	47.0833	4.32708
		95% Lower Bound	35.9602	
		Confidence Upper Bound		
Interval for				
Mean		58.2064		
5% Trimmed Mean		47.0093		
Median		46.2500		
Variance		112.342		
Std. Deviation		10.59914		
Minimum		32.50		
Maximum		63.00		
Range		30.50		
Interquartile Range		17.75		
Skewness	.244	.845		
Kurtosis	.051	1.741		

Lampiran 7.
Out Put SPSS (Statistik Deskriptif Koloni Bakteri Limpa)

Descriptives

		klp		Statistic	Std. Error	
koloni	kontrol	Mean		152,5000	23,76096	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	91,4205		
			Upper Bound	213,5795		
		5% Trimmed Mean		153,1111		
		Median		164,0000		
		Variance		3387,500		
		Std. Deviation		58,20223		
		Minimum		65,00		
		Maximum		229,00		
		Range		164,00		
		Interquartile Range		98,75		
		Skewness		-,409	,845	
		Kurtosis		-,269	1,741	
		perlakuan-1	Mean		36,5000	11,65833
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6,5313	
			Upper Bound	66,4687		
	5% Trimmed Mean			35,5556		
	Median			35,5000		
	Variance			815,500		
	Std. Deviation			28,55696		
	Minimum			5,00		
	Maximum			85,00		
	Range			80,00		
	Interquartile Range			45,50		
	Skewness			,887	,845	
	Kurtosis			,999	1,741	
	perlakuan-2		Mean		97,6667	12,41415
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	44,2529	
				Upper Bound	151,0804	
			5% Trimmed Mean		.	
			Median		98,0000	
		Variance		462,333		
		Std. Deviation		21,50194		
Minimum			76,00			
Maximum			119,00			
Range			43,00			
Interquartile Range			.			
Skewness			-,070	1,225		
Kurtosis			.	.		

Lampiran 8.
Out Put SPSS (Statistik Deskriptif Gambaran Histopatologi Hepar)

Descriptives

	klp		Statistic	Std. Error	
histopatologihepar	Kontrol	Mean	.5076	.02731	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.4374	
			Upper Bound	.5778	
		5% Trimmed Mean	.5084		
		Median	.5227		
		Variance	.004		
		Std. Deviation	.06691		
		Minimum	.41		
		Maximum	.59		
		Range	.18		
		Interquartile Range	.11		
		Skewness	-.418	.845	
		Kurtosis	-.859	1.741	
		Perlakuan-1	Mean	.3258	.05037
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.1963
	Upper Bound			.4552	
	5% Trimmed Mean		.3291		
	Median		.3636		
	Variance		.015		
	Std. Deviation		.12337		
	Minimum		.14		
	Maximum		.45		
	Range		.32		
	Interquartile Range		.22		
	Skewness		-.712	.845	
	Kurtosis		-.955	1.741	
	Perlakuan-2		Mean	.2818	.07385
95% Confidence Interval for Mean			Lower Bound	.0768	
		Upper Bound	.4869		
5% Trimmed Mean		.2778			
Median		.2273			
Variance		.027			
Std. Deviation		.16514			
Minimum		.14			
Maximum		.50			
Range		.36			
Interquartile Range		.32			
Skewness		.567	.913		
Kurtosis		-2.231	2.000		

Lampiran 9.
Out Put SPSS (*Oneway ANOVA dan Post Hoc test (LSD)*)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
neutrofil	Between Groups	218.111	2	109.056	1.358	.287
	Within Groups	1204.167	15	80.278		
	Total	1422.278	17			
histopatologihepar	Between Groups	.163	2	.082	5.509	.017
	Within Groups	.208	14	.015		
	Total	.371	16			
koloni	Between Groups	40392.067	2	20196.033	11.046	.002
	Within Groups	21939.667	12	1828.306		
	Total	62331.733	14			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) klp	(J) klp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
neutrofil	kontrol	perlakuan-1	7.83333	5.17294	.151	-3.1925	18.8592
		perlakuan-2	1.00000	5.17294	.849	-10.0259	12.0259
	perlakuan-1	kontrol	-7.83333	5.17294	.151	-18.8592	3.1925
		perlakuan-2	-6.83333	5.17294	.206	-17.8592	4.1925
	perlakuan-2	kontrol	-1.00000	5.17294	.849	-12.0259	10.0259
		perlakuan-1	6.83333	5.17294	.206	-4.1925	17.8592
histopatologihepar	kontrol	perlakuan-1	.18182(*)	.07030	.022	.0310	.3326
		perlakuan-2	.22576(*)	.07373	.008	.0676	.3839
	perlakuan-1	kontrol	-.18182(*)	.07030	.022	-.3326	-.0310
		perlakuan-2	.04394	.07373	.561	-.1142	.2021
	perlakuan-2	kontrol	-.22576(*)	.07373	.008	-.3839	-.0676
		perlakuan-1	-.04394	.07373	.561	-.2021	.1142
koloni	kontrol	perlakuan-1	116.00000(*)	24.68674	.001	62.2122	169.7878
		perlakuan-2	54.83333	30.23496	.095	-11.0430	120.7097
	perlakuan-1	kontrol	-116.00000(*)	24.68674	.001	-	-62.2122
		perlakuan-2	-61.16667	30.23496	.066	169.7878	-
	perlakuan-2	kontrol	-54.83333	30.23496	.095	127.0430	4.7097
		perlakuan-1	61.16667	30.23496	.066	-	11.0430

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 10.
Pembuatan Ekstrak Meniran dengan Metode Soxlet

Bahan:

Nama tanaman : Meniran (*Phyllanthus niruri L*)

Asal tanaman : Reza Florist and Herbal

Bagian tanaman yang dipakai : akar, batang, buah, dan daun.

Cara:

Bahan meniran (*Phyllanthus niruri L*) kering dibungkus dalam selongsong (kertas saring) dan dimasukkan ke dalam peralatan *Soxlet*. Ekstraksi dalam keadaan panas dilakukan dengan pelarut Etanol dengan titik didih 82 °C hingga larutan tidak berwarna lagi, yaitu sekitar 20 kali sirkulasi. Selanjutnya ekstrak Etanol dievaporasi dengan *Rotary Evaporator* hingga diperoleh *Crude* sebanyak yang diinginkan (± 3 % dari bahan).

Untuk pembuatan dosis 0,25 mg/ 0,5 cc (0,5 mg/cc), 100 mg ekstrak kering dilarutkan ke dalam aquadest sebanyak 200 cc. Sedangkan untuk pembuatan dosis 0,125 mg/ 0,5 cc (0,25mg /cc), 50 cc dari larutan I ditambah dengan 50 cc aquadest. Dosis pemberian adalah masing-masing 3 x 0,5 cc.

