



PENGARUH PEMBERIAN REBUSAN BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP JUMLAH KUMAN PADA LIMPA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium*

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :
DIAN KUSUMANINGRUM
G2A002055

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006

PENGARUH PEMBERIAN REBUSAN BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP JUMLAH KUMAN PADA LIMPA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium*

Dian Kusumaningrum³, Winarto⁴

Abstrak

Latar Belakang : Insidensi demam tifoid di Indonesia masih cukup tinggi. Salah satu cara masyarakat untuk menanganinya adalah dengan pengobatan tradisional. Mahkota dewa sebagai salah satu bentuk obat tradisional mempunyai kandungan senyawa saponin dan flavanoid dalam buahnya yang berfungsi sebagai *immunostimulant*. Pada penelitian ini diharapkan mahkota dewa dapat menurunkan jumlah koloni kuman *Salmonella typhimurium* pada organ-organ yang terinfeksi. Limpa merupakan salah satu organ retikuloendotelial yang dapat menjadi tempat bersarangnya kuman *Salmonella typhimurium*.

Tujuan : Mengetahui efek pemberian buah mahkota dewa terhadap hasil hitung jumlah kuman di limpa mencit

Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metode : Penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *The Post Test-Only Control Group Design*. Sampel adalah limpa dari 20 ekor mencit betina strain *Balb/c*, umur 6-8 minggu, berat badan 20-25 gram, dan dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. K(+) sebagai kontrol, diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Kelompok perlakuan (P1, P2, P3) diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari ke-8 dengan diberi rebusan buah mahkota dewa dosis 0,06 ml, 0,12 ml, dan 0,24 ml berurutan, sebelum infeksi, selama delapan hari.

Hasil : Rerata jumlah kuman pada kelompok K(+)= $359,225 \times 10^5$, P1= $75,639 \times 10^5$, P2= $63,601 \times 10^5$, dan P3= $61,725 \times 10^5$. Uji beda dengan lebih dari 2 sampel independent antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan hasilnya terdapat perbedaan yang tidak bermakna ($p = 0,289$).

Kesimpulan : Mahkota dewa dapat menurunkan jumlah koloni kuman pada lien mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* tetapi tak bermakna secara statistik.

Kata Kunci : Mahkota dewa, koloni kuman, limpa, *Salmonella typhimurium*

³ Mahasiswa semester VIII Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

⁴ Staf pengajar bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

The Effect of Phaleria macrocarpa on The Number of Salmonella typhimurium Colony in Balb/c Mice Spleen Infected by Salmonella typhimurium

Dian Kusumaningrum¹, Winarto²

Abstract

Background : The incidence of typhoid fever in Indonesia is still high. One of people way to solve this problem is using traditional medicine. *Phaleria macrocarpa* as the traditional medicine contains agents such as saponin and flavanoid that believed have immunomodulator effect. This study can be expected to reduce the number of *Salmonella typhimurium* colony in the infected organ. Spleen is chosen in this study because spleen is one of reticuloendothelial organ which can be the site of *Salmonella typhimurium* growth.

Objective : To find out the effect of *Phaleria macrocarpa* on the number *Salmonella typhimurium* colony in the *Balb/c* mice's spleen infected by *Salmonella typhimurium*.

Method : This was laboratorial experiment study using *Post Test-Only Control Group Design*. The sample were spleen tissues from 20 female *Balb/c* mice, 6-8 weeks old, 20-25 gram body weight and divided into four groups which are one control group and three treatment groups. K(+) is control group. The treatment groups (P1, P2, P3) treated with 0,06 ml, 0,12 ml, and 0,24 ml of *Phaleria macrocarpa* each day for eight days. All mices infected by *Salmonella typhimurium* in the 8th of 10 days.

Result : The average of the number bacteria colony in K(+)= $359,225 \times 10^5$, P1= $75,639 \times 10^5$, P2= $63,601 \times 10^5$, and P3= $61,725 \times 10^5$.The comparation with morethan 2-independent variables between control group and experimental groups has no significant outcomes ($p = 0,289$).

Conclusion : *Phaleria macrocarpa* can decrease the number of bacteria colony in the mice liver infected by *Salmonella typhimurium* but has no significant outcomes in statistic.

Keywords : *Phaleria macrocarpa*, bacteri colony, spleen, *Salmonella typhimurium*

¹ Student of Medical Faculty of Diponegoro University Semarang

² Lecture in Departement of Microbiology Medical Faculty of Diponegoro University Semarang

PENDAHULUAN

Demam tifoid adalah penyakit sistemik akut akibat infeksi *Salmonella typhi*. Penyakit ini merupakan penyakit menular yang dapat menyerang banyak orang sehingga dapat menimbulkan wabah. Penderita dewasa muda sering mengalami komplikasi berat berupa perdarahan dan perforasi usus yang tidak jarang berakhir dengan kematian.¹

Demam tifoid disebabkan oleh infeksi kuman *Salmonella typhi* yang termasuk *Enterobacteriaceae* (kuman enterik batang gram negatif) dan bersifat anaerob fakultatif atau aerob, tak berspora, intraseluler fakultatif. *Salmonella typhi* dan *paratyphi* hanya patogen terhadap manusia, sedangkan *Salmonella typhimurium* hanya patogen terhadap tikus namun akan memberikan kelainan yang serupa dengan demam tifoid pada manusia. Oleh karena itu pada penelitian eksperimental infeksi demam tifoid yang dipakai adalah *Salmonella typhimurium*.^{2,3,4}

Tingginya angka morbiditas dan mortalitas demam tifoid membuat berbagai pihak berupaya untuk menyelesaikan problem ini. Saat ini di Indonesia sedang berkembang paradigma baru dalam bidang kesehatan, yaitu penggunaan obat-obat tradisional. Salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional dan mempunyai efek *immunostimulant* adalah buah mahkota dewa.^{5,6} Dalam kulit buah mahkota dewa yang mempunyai nama latin *Phaleria macrocarpa* terkandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavanoid.^{5,6,7} Diduga senyawa flavanoid dan saponin buah mahkota dewa yang dapat mengaktifkan makrofag.

Dalam infeksi intraseluler khususnya oleh *Salmonella typhimurium*, makrofag berperan sebagai fagosit profesional dan *Antigen Presenting Cell (APC)*⁸. *Salmonella typhimurium* yang terdapat di dalam sirkulasi akan difagositosis oleh makrofag kemudian diangkut ke jaringan limfoid sekunder seperti limpa, sedangkan makrofag yang terdapat di limpa akan memakan *Salmonella typhimurium* yang masuk ke limpa itu sendiri. Proses yang terjadi di dalam makrofag, peptida *Salmonella typhimurium* akan diikat oleh MHC kelas I. Kompleks antigen-MHC tersebut akan bergerak ke permukaan sel APC untuk dipresentasikan ke sel T. Reseptor sel CD⁸⁺ akan mengikat antigen yang dipresentasikan MHC kelas I tersebut. Interaksi yang terjadi antara antigen-MHC dengan CD⁸⁺ mengakibatkan makrofag dengan limfosit T meningkatkan sekresi sitokin yaitu IL-12. Interleukin yang terbentuk akan mengaktifkan sel NK, menstimuli perkembangan sel Th-1 dan mengaktifkan sel T dan CD⁸⁺ lain. Ketiga jenis sel tersebut akan memproduksi dan mensekresi IFN- γ yang akan mengaktifasi makrofag menjadi makrofag aktif yang dapat membunuh bakteri intraseluler. Selain mengaktifasi makrofag, IL-12 juga

akan mengaktivasi limfosit T menjadi T sitotoksik dan limfosit B memproduksi antibodi. Limfosit T sitotoksik dapat merusak membran sel yang terinfeksi bakteri intraseluler sehingga bakteri tersebut dapat berikatan dengan antibodi dalam plasma. Kompleks antigen-antibodi tersebut mengaktifkan komplemen sehingga dapat membunuh bakteri tersebut^{8,9}

Rebusan buah mahkota dewa yang berfungsi sebagai stimulator aktivitas sel fagosit terhadap infeksi *Salmonella typhi* diharapkan dapat menurunkan jumlah koloni kuman pada organ-organ yang terinfeksi, termasuk limpa yang dipilih pada penelitian ini karena limpa merupakan salah satu organ retikuloendotelial yang dapat menjadi tempat bersarangnya *Salmonella typhi*¹⁰. Dalam patogenesis infeksi *Salmonella typhi*, setelah terjadi bakteremia primer kuman *Salmonella typhi* dalam makrofag masuk ke sirkulasi darah selanjutnya menyebar ke organ retikuloendotelial dan bersarang di limpa. Di dalam limpa, bakteri meninggalkan makrofag dan berkembang biak di luar sel atau ruang sinusoid. Kemudian bakteri kembali ke usus dan selanjutnya beredar ke aliran darah menyebabkan bakteremia yang kedua sehingga menimbulkan gejala infeksi sistemik demam tifoid^{10,11}.

Tujuan dalam penelitian ini adalah menghitung jumlah koloni kuman *Salmonella typhimurium* pada limpa mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* yang dipengaruhi oleh mekanisme *immunostimulant* serta membandingkan jumlah koloni kuman pada limpa mencit *Balb/c* dengan dan tanpa pemberian rebusan buah mahkota dewa.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *The Post Test-Only Control Group Design*. Penilaian hanya dilakukan pada *post test* dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimental dan kontrol. Sampel diambil secara acak dari populasi yang terjangkau dengan kriteria inklusi mencit jenis kelamin betina, berat badan 20-25 gram, umur 6-8 minggu, kondisi sehat, tidak ada kelainan anatomis, sedangkan kriteria eksklusinya adalah mencit tampak sakit, mencit mati selama perlakuan berlangsung. Besar masing-masing sampel ditentukan 5 ekor per kelompok. Jumlah ini sesuai dengan ketentuan jumlah minimal yang ditetapkan WHO⁽¹²⁾. Alat dan bahan penelitian ini adalah kandang mencit, sonde lambung (jarum kanul), spuit, timbangan, larutan PBS atau NaCl fisiologis steril, tabung reaksi, media SS agar, vortex (pengaduk), mortir, lampu spiritus, oese, laminar flow, inkubator, gelas ukur, pipet, panci, kompor, rebusan buah

mahkota dewa produk paten Ning Harmanto, mencit strain *Balb/c*, pakan mencit standar, dan air.

Mencit diadaptasikan dahulu di ruang pemeliharaan selama 1 minggu dengan diberi ransupakan standar secara ad libitum. Sebanyak 20 ekor mencit dibagi secara random menjadi 4 kelompok. 5 ekor mencit sebagai kelompok I, yaitu kelompok kontrol, 5 ekor mencit masing-masing sebagai kelompok II, III, dan IV, yaitu kelompok perlakuan. Pemberian rebusan buah mahkota dewa oral adalah pemberian seduhan buah mahkota dewa lewat sonde lambung satu kali sehari dengan dosis masing-masing kelompok sebanyak 0,06cc; 0,12 cc; dan 0,24 cc pada kelompok perlakuan. Pemberian dilakukan setiap hari sampai hari ke-8. Inokulasi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal adalah satu kali injeksi 1×10^6 kuman *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal. Infeksi dilakukan pada seluruh kelompok pada hari ke-8 setelah pemberian rebusan buah mahkota dewa. Jumlah kuman adalah hasil hitung kuman pada media SS agar secara kuantitatif. Pengenceran dilakukan bertingkat sampai perbandingan 1:1000, caranya dengan menyediakan 60 tabung untuk empat kelompok dan masing-masing tabung ditambahkan 4,5 ml NaCl fisiologis steril. Pada tabung I ditambahkan 0,5 ml larutan jaringan dan lakukan homogenisasi, 0,5 ml larutan tabung I dimasukkan ke tabung II, setelah itu 0,5 ml larutan tabung II dimasukkan ke tabung III. Sebanyak 0,1 ml larutan dari tabung I, II dan III diinokulasi dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Hasil dihitung dalam Cfu/gram jaringan.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah rebusan buah mahkota dewa yang merupakan skala ordinal. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah hasil hitung kuman yang merupakan skala numerik. Data yang diperoleh dari 4 kelompok sampel diolah dengan program komputer SPSS 13.0. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Jika didapatkan data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji statistik parametrik ANOVA, dan jika didapatkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji statistik *Post Hoc (Tukey HSD)*. Sedang jika didapatkan distribusi yang tidak normal, maka dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Dan jika dari hasil uji statistik tersebut ada perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji statistik *Mann-Whitney*, dengan ketentuan:

- a. jika $P \leq 0,01$, maka ada perbedaan yang sangat bermakna
- b. jika $P \leq 0,05$, maka ada perbedaan yang bermakna
- c. jika $P > 0,05$, maka tidak ada perbedaan yang bermakna

HASIL

Perbedaan keadaan mencit setelah diinfeksi kuman *Salmonella typhimurium* disajikan pada tabel berikut :

Tabel 1. Keadaan mencit sebelum dan setelah infeksi *Salmonella typhimurium*

Waktu	Keadaan	Aktivitas	Makan/ Minum	Bulu	Menggigil	Konstipasi
Pre-perlakuan		-	-	-	-	-
Hari 1 post-perlakuan		+	+	+	+	-
Hari 2 post-perlakuan		+	+	+	+	+

Keterangan :

- : Tidak terjadi perubahan keadaan mencit
- + : Perubahan keadaan karena perlakuan

Hasil hitung jumlah koloni kuman jaringan limpa pada penelitian ini disajikan pada tabel berikut :

Tabel 2. Jumlah kuman pada jaringan limpa mencit kelompok kontrol

K(+)	Berat jaringan	Pengenceran		
	limpa (gr)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	0,1419	>300	>300	60
2	0,1540	37	3	5
3	0,1020	>300	>300	193
4	0,1288	>300	157	33
5	0,1888	>300	>300	105

Keterangan :

K(+): Kelompok yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Tabel 3. Jumlah kuman pada jaringan limpa mencit kelompok perlakuan satu

P1	Berat jaringan	Pengenceran		
	limpa (gr)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	0,1254	>300	45	9
2	0,1223	>300	39	14
3	0,1564	78	2	3
4	0,1011	>300	98	32
5	0,0916	274	173	111

Keterangan :

P1 : Kelompok yang diberi rebusan buah mahkota dewa 0,06 cc dan diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Tabel 4. Jumlah kuman pada jaringan limpa mencit kelompok perlakuan dua

P2	Berat jaringan	Pengenceran		
	limpa (gr)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	0,1459	>300	41	14
2	0,1728	>300	194	71
3	0,1790	>300	139	33
4	0,1394	>300	94	44

5	0,1471	>300	35	13
---	--------	------	----	----

Keterangan :

P2 : Kelompok yang diberi rebusan buah mahkota dewa 0,12 cc dan diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Tabel 5. Jumlah kuman pada jaringan limpa mencit kelompok perlakuan tiga

P3	Berat jaringan		Pengenceran	
	limpa (gr)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	0,0879	>300	71	36
2	0,1114	>300	86	62
3	0,1474	124	63	6
4	0,1272	>300	32	5
5	0,1407	63	9	4

Keterangan :

P3 : Kelompok yang diberi rebusan buah mahkota dewa 0,24 cc dan diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Jumlah koloni kuman *Salmonella typhimurium* per gram jaringan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Cfu/gram jaringan} = \frac{\text{Jumlah Cfu} \times \text{Pengenceran} \times 10 \text{ (diinokulasikan hanya 0,1 ml per plate)}}{\text{Berat jaringan}}$$

Tabel 2. Jumlah kuman *Salmonella typhimurium* per gram jaringan dari kultur limpa

	K(+)(Cfu/gram)	P1 (Cfu/gram)	P2 (Cfu/gram)	P3(Cfu/gram)
	$2,114 \times 10^7$	$1,794 \times 10^6$	$1,405 \times 10^6$	$1,226 \times 10^7$
	$1,201 \times 10^5$	$1,597 \times 10^5$	$1,308 \times 10^7$	$1,584 \times 10^7$
	$9,461 \times 10^7$	$2,494 \times 10^5$	$6,550 \times 10^6$	$1,279 \times 10^6$
	$9,453 \times 10^6$	$1,033 \times 10^7$	$9,577 \times 10^6$	$1,258 \times 10^6$
	$5,429 \times 10^7$	$2,384 \times 10^7$	$1,190 \times 10^6$	$2,239 \times 10^5$
Σ	$1,796 \times 10^8$	$3,782 \times 10^7$	$3,180 \times 10^7$	$3,086 \times 10^7$
n	5	5	5	5
Mean	$3,592 \times 10^7$	$7,564 \times 10^6$	$6,360 \times 10^6$	$6,172 \times 10^6$
Std.	$3,867 \times 10^7$	$9,938 \times 10^6$	$5,167 \times 10^6$	$7,315 \times 10^6$

Dari tabel 2 dapat diketahui perbandingan jumlah rata- rata kuman *Salmonella*

typhimurium per gram jaringan, yaitu pada kelompok K(+) adalah $3,592 \times 10^7$, P1 adalah $7,564 \times 10^6$, P2 adalah $6,360 \times 10^6$, P3 adalah $6,172 \times 10^6$. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah rata – rata kuman kelompok mahkota dewa setengah dosis lebih kecil daripada kelompok kontrol positif tetapi lebih besar daripada kelompok mahkota dewa satu dan dua dosis, jumlah rata-rata kuman kelompok mahkota dewa satu dosis lebih kecil daripada kelompok kontrol positif dan kelompok mahkota dewa setengah dosis, tetapi lebih besar dari kelompok mahkota

dewa dua dosis, jumlah rata-rata kuman kelompok dua dosis lebih kecil daripada kelompok kontrol positif, kelompok mahkota dewa satu maupun setengah dosis.

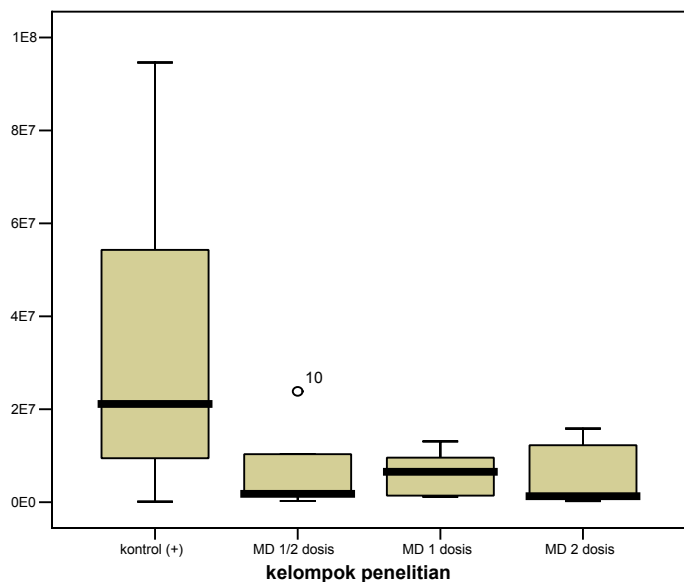
Dari data perbandingan jumlah rata – rata kuman *Salmonella typhimurium* per gram jaringan tersebut kemudian diuji normalitasnya dengan uji Shapiro-Wilk dan didapatkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$) tetapi tidak homogen variannya.. Selanjutnya dilakukan analisis dengan uji Kruskal Wallis, dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk membandingkan jumlah kuman antar kelompok

Tabel 3. Hasil uji statistik perbandingan antara kelompok kontrol (+),mahkota dewa setengah dosis, satu dosis, dan dua dosis

Kelompok	Taraf signifikansi
K(+)	$p = 0,289$ ($p > 0,05$)
P1	
P2	
P3	

Dengan uji Kruskal Wallis terhadap keempat kelompok diatas didapatkan hasil $p=0,289$. Hasil tersebut menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna pada perbandingan hitung jumlah koloni kuman antar kelompok kontrol (+), mahkota dewa setengah dosis, satu dosis, dan dua dosis.

Gambar 1. Grafik box plot hitung jumlah koloni kuman



Dari grafik diatas didapatkan bahwa nilai median jumlah kuman pada kelompok mencit yang diberi mahkota dewa lebih kecil daripada kelompok kontrol yang tidak diberi mahkota dewa yang diindikasikan dengan terjadinya penurunan jumlah kuman.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian diperoleh jumlah rata-rata kuman pada kelompok mencit yang diberi mahkota dewa (P) lebih kecil daripada kelompok kontrol (K). Semakin besar dosis mahkota dewa yang diberikan semakin kecil jumlah kuman dalam jaringan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian mahkota dewa dapat menurunkan jumlah koloni kuman pada limpa mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa mahkota dewa dapat meningkatkan daya tahan tubuh sehingga pada akhirnya makrofag teraktivasi dan dapat membunuh bakteri intraseluler. Kemampuan ini disebabkan karena senyawa yang dikandungnya yaitu flavanoid dan saponin yang diduga dapat mengaktifkan makrofag. Flavanoid yang bersifat lipofilik membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dengan dinding sel kuman serta merusak membran sel kuman.

Namun demikian, secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam penurunan jumlah koloni kuman antara kelompok kontrol dan kelompok mahkota dewa. Hal ini mungkin disebabkan antara lain karena adanya perbedaan daya tahan tubuh alamiah pada masing-masing mencit terhadap infeksi *Salmonella typhimurium* serta dosis mahkota dewa yang digunakan belum cukup kuat untuk dapat menurunkan jumlah koloni kuman pada limpa mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Tidak menutup kemungkinan juga adanya kontaminasi pada saat kultur jaringan sehingga hanya sebagian dari keseluruhan jumlah koloni yang dapat diolah menjadi data. Data yang jumlah koloni kumannya <30 atau >300 tidak memenuhi syarat untuk dimasukkan dalam uji analisis sehingga mempengaruhi tingkat signifikansi penurunan jumlah kuman pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini didapatkan bahwa mahkota dewa dapat menurunkan rerata jumlah koloni kuman pada limpa mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* meskipun penurunan tersebut tidak bermakna secara statistik.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian mahkota dewa sebagai *immunostimulant* dengan menggunakan dosis bertingkat untuk menentukan dosis yang efektif dalam menurunkan jumlah koloni

kuman pada limpa mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada dr. Winarto, DMM, Sp. M, Sp. MK yang membimbing dan membantu dalam penelitian ini, Staf Laboratorium Mikrobiologi, Staf Laboratorium Biokimia, serta Staf Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atas bantuan dan fasilitas yang telah disediakan, serta kedua orang tua dan teman-teman atas bantuan dan dukungannya hingga terselesaikannya tugas ini.