

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sirih merah

Sirih merah merupakan tanaman yang berasal dari Peru, Amerika Selatan dan tumbuh subur di Indonesia. Nama ilmiahnya adalah *Piper crocatum* Ruiz and Pav. Sirih merah dapat tumbuh dengan baik di tempat yang teduh, tidak terlalu banyak air dan sinar matahari.¹⁴ Kedudukan sirih merah dalam taksonomi yaitu:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz and Pav.

Tumbuhan sirih merah umumnya merambat atau menjalar dengan panjang mencapai 5-10 m. Batangnya bulat berwarna hijau atau keunguan, beruas dengan panjang ruas 3-8 cm. Bentuk daun menjantung dengan permukaan daun bagian atas cembung dan mengkilap sedangkan permukaan bagian bawahnya cekung dengan pertulangan daun menonjol. Panjang daun 6-15 cm dan warnanya hijau kemerahan.^{9,15}

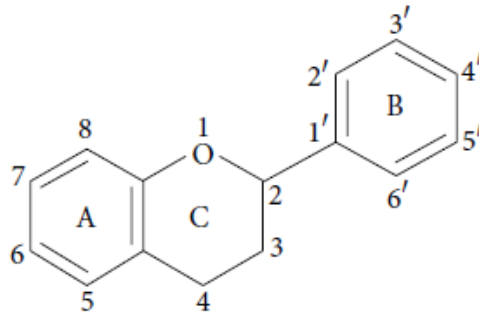


Gambar 1. Daun sirih merah¹⁴

Berbagai penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa ekstrak etanol sirih merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin. Penelitian yang dilakukan oleh Suhermanto (2013) menunjukkan pada ekstrak etanol 30 % sirih merah mengandung flavonoid sebesar 6.09 ± 0.26 mg QE/g, tanin sebesar 3.36 ± 1.12 mg/g dan alkaloid sebesar 187.43 ± 11.83 mg/g.¹⁶ Proses ekstraksi menggunakan etanol 70% diketahui dapat mengekstraksi senyawa aktif seperti polifenol, flavonoid, tanin dan alkaloid.¹⁷

Tanin diketahui memiliki efek imunomodulator. Tanin meningkatkan aktivasi limfosit melalui induksi IL-2R α dan proliferasi limfosit yang ditandai dengan adanya pembelahan sel.¹⁸ Flavonoid merupakan senyawa fenol terhidroksilasi yang tersusun dari 15 rantai karbon dan 2 cincin benzena yang dihubungkan oleh cincin piran heterosiklik. Berbagai studi menyatakan flavonoid memiliki efek perlindungan dari berbagai infeksi dan penyakit degeneratif, seperti penyakit kardiovaskular dan kanker. Flavonoid memiliki manfaat sebagai

antioksidan, hepatoprotektif, antibakterial, antivirus, antikanker dan antiinflamasi.¹⁹



Gambar 2. Struktur dasar flavonoid¹⁹

2.2 Limfosit

Limfosit ditemukan sebanyak 20% dari jumlah leukosit yang ada dalam darah. Limfosit kecil memiliki diameter 7-10 μm , nukleusnya berwarna ungu kehitaman dengan pewarnaan *Wright* dan sitolasmanya kecil. Limfosit besar diameternya berukuran 10-12 μm , sitoplasmanya besar dan bergranula. Limfosit yang beredar dalam darah adalah sel T, sel B, dan sel NK. Pada timus, sebagian besar limfosit berupa limfosit T, sedangkan limfosit B banyak ditemukan pada limpa dan jaringan limfoid.²⁰

2.2.1 Limfosit T

Limfosit T merupakan populasi terbanyak dalam jaringan limfoid. Sel T berasal dari progenitor limfosit di sumsum tulang yang kemudian bermigrasi ke timus. Pada proses diferensiasi di timus, sel T CD3^+ mengekspresikan CD4^+ atau CD8^+ . Sel epitel timus memproduksi beberapa sitokin, salah satunya IL-7 yang

berperan menginduksi proliferasi CD3⁺. Limfosit T sitotoksik memiliki penanda molekul CD8⁺ dan limfosit T *helper* memiliki penanda molekul CD4⁺. Limfosit T berperan dalam imunitas seluler. Limfosit T *helper* berperan sebagai regulator sistem imun dan berfungsi mengaktifkan sel lain. Sel Th1 berperan mengaktifkan sel makrofag yang dihuni oleh bakteri intraseluler sehingga bakteri tersebut mati dalam sel makrofag. Sel Th1 ini juga berfungsi menghasilkan berbagai sitokin seperti IFN- γ , TNF- α dan IL-2. IL-2 berperan penting dalam proliferasi sel T. Limfosit Th2 berperan dalam aktivasi limfosit B agar memproduksi antibodi. Limfosit T sitotoksik berinteraksi dengan antigen dan berfungsi melisiskan sel-sel yang terinfeksi.^{20,21}

2.2.2 Limfosit B

Limfosit B berperan dalam sistem imun humoral dan pembentukan antibodi. Limfosit B yang teraktivasi akan mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi plasmasit yang akan melepaskan molekul-molekul imunoglobulin (antibodi). Berbagai sitokin mempengaruhi perkembangan sel B. IL-4 dalam kadar rendah dapat menginduksi diferensiasi sel B, namun pada kadar tinggi dapat menghambat diferensiasi sel B. Sitokin lain seperti IL-2, IL-5, IL-6 dan IL-11 dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma.²¹

2.2.3 Sel NK

Sel NK tidak memiliki molekul penanda dan reseptor untuk mengenali antigen seperti sel limfosit lainnya. Sel NK membunuh sel dengan mekanisme

ADCC (*Antibody Dependent Cytotoxicity*) yaitu melalui perantara antibodi. Molekul antibodi akan membungkus sel sasaran dan berikatan dengan reseptor sel NK pada bagian Fc.²¹

2.2.4 Proliferasi limfosit

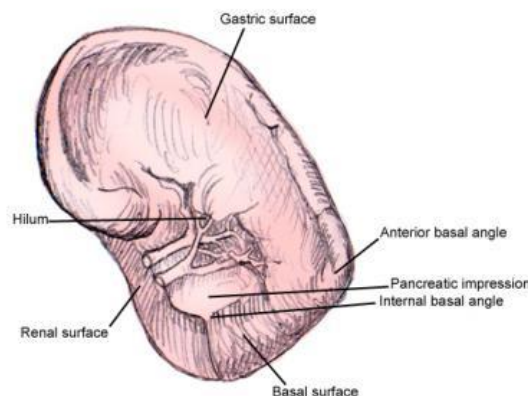
Proliferasi dan pembelahan sel eukariotik terbagi menjadi 4 fase. Fase pertama (G1) adalah persiapan untuk replikasi DNA. Fase kedua (S) menghasilkan dua utas kromosom yang identik. Pada fase ketiga (G2) terjadi proses sintesis protein. Fase M merupakan fase pembelahan, dimana nukleus dan sitoplasma membelah.²²

Proliferasi limfosit dimulai saat sel T atau sel B berikatan dengan ligan yang kemudian meningkatkan aktivitas *protein tyrosine kinase* (PTK) sitoplasma. PTK akan mengaktivasi enzim *phospholipase C- γ 1* dan menyebabkan influx ion Ca. Terjadi peningkatan laju metabolisme protein dan sintesis RNA pada limfosit. Kromatin berkurang kepadatannya selama transkripsi dan sel bersiap untuk proses mitosis. Setelah 2-4 jam, protein spesifik yang berperan dalam pengaturan proliferasi sel dapat ditemukan pada nukleus. Terjadi perubahan morfologi sel (*blast transformation*), yaitu peningkatan diameter karena pembesaran sitoplasma dan inti sel, kromatin inti renggang dan berwarna pucat, dan terbentuk nukleolus prominen. Setelah 8-12 jam, sel dapat terlihat di mikroskop cahaya sebagai limfoblast. Sintesis DNA terjadi dalam 18-24 jam setelah adanya stimulasi. Pembelahan sel pertama terjadi 2-4 jam berikutnya dan dapat berulang dengan

interval 6 jam. Sel efektor yang terbentuk akan mengalami maturisasi dalam beberapa hari.²³

2.3 Limpa

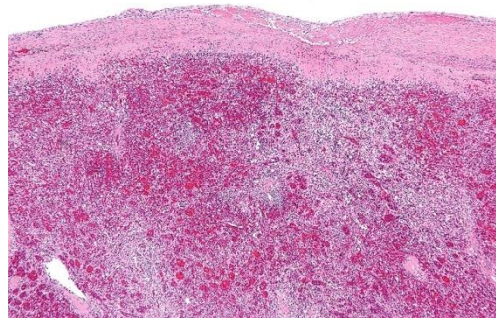
Limpa merupakan organ yang terletak di kuadran kiri atas dorsal abdomen dibawah diafragma. Beratnya rata-rata 75-100 gram dan dapat mengecil seiring bertambahnya usia. Limpa tambahan dapat dijumpai pada 30% kasus dan letaknya tersering di daerah hilus. Aliran darah limpa masuk melalui arteri splenalis dan keluar melalui vena splenalis. Limpa diselaputi oleh simpai yang bercabang-cabang yang membungkus parenkim.²⁴



Gambar 3. Anatomi Limpa
(<http://emedicine.medscape.com>)

Limpa merupakan organ limfoid sekunder (perifer) terbesar. Parenkim limpa dibentuk oleh sel fagosit mononuklear (sistem retikuloendotel) dan limfoid. Pulpa putih dibentuk oleh jaringan limfoid yang mengelilingi pembuluh darah dan menyusun 5%-13% jaringan limpa. Pulpa putih dibagi menjadi 3 kompartemen, yaitu sentral (berwarna hitam dan terdiri dari limfosit kecil), intermedia, dan

permukaan. Sel T dapat ditemukan di sekitar arterioli. Pulpa merah menyusun 80%-88% jaringan limpa. Pulpa merah merupakan sumber hematopoiesis pada masa embrio dan dapat berlangsung sampai dewasa pada keadaan stres. Pulpa merah juga berfungsi untuk penghancuran trombosit yang rusak, destruksi eritrosit tua dan metabolisme zat besi. Zona marginal terletak diantara pulpa merah dan putih, terdiri atas sinusoid dan kapiler. Sel-sel yang terdapat pada zona marginal diantaranya sel APC, makrofag, sel plasma, sel T dan sel B.^{25,26,27}



Gambar 4. Histologi Limpa
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Spleen>)

2.4 *Salmonella typhimurium*

Salmonella merupakan bakteri gram negatif yang bersifat anaerob fakultatif. *Salmonella* bersifat motil dan menghasilkan asam. Bakteri ini tidak memfermentasikan laktosa dan membentuk koloni pucat pada media agar MacConkey, sedangkan pada media *xylose deoxycholate* (XLD) *Salmonella* membentuk koloni pucat dengan bagian tengah berwarna hitam akibat produksi H_2S .²⁸ *Salmonella typhimurium* merupakan patogen pada tikus dan telah digunakan sebagai model infeksi tifoid pada tikus. Infeksi *Salmonella*

typhimurium pada tikus menyebabkan manifestasi seperti infeksi *Salmonella typhi* pada manusia.^{4,5,29} Klasifikasi menurut taksonomi yaitu:

Kerajaan : Bacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : Salmonella
Species : *Salmonella typhimurium*³⁰

Salmonella memiliki antigen H (flagella) dan O (somatik). Antigen H memiliki bentuk yang berbeda-beda yang disebut dengan “fase”. *Salmonella* serotipe *typhi* memiliki antigen kapsul yang disebut “vi” sehingga *Salmonella typhi* bersifat invasif. Bakteri ini tahan terhadap pH lambung dan menginvasi usus, menimbulkan reaksi inflamasi. Dosis infeksi relatif tinggi yaitu sekitar 10^6 organisme.²⁸

Transmisi *Salmonella* biasanya melalui makanan atau air yang terkontaminasi, kemudian menginfeksi melalui jalur fecal-oral. Infeksi *Salmonella* serotipe *typhi* dapat menyebabkan penyakit tifoid. Demam merupakan gejala utama tifoid dan dapat berlangsung selama 5-9 hari. Pembesaran limfonodi, hepar dan limpa juga dapat ditemukan bersamaan dengan lesi granulomatous.²⁹

2.5 Respon imun tubuh terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*

Infeksi *Salmonella* diawali dengan adanya kontak antara *Salmonella* dengan dinding usus. Bakteri bergerak sepanjang epitel usus kemudian mencapai sel M dan *Peyer's patches*. Hal ini memicu pengenalan oleh antigen-presenting cells (APC) sehingga terjadi fagositosis oleh makrofag. Makrofag yang terinfeksi akan memicu sekresi TNF- α dan IL-12. Sitokin-sitokin tersebut akan memicu sel NK untuk memproduksi IFN- γ , yang akan mengaktivasi makrofag dan meningkatkan aktivitas bakterisidalnya.^{31,32}

Mekanisme imunitas tersebut diketahui dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhimurium*, namun tidak dapat membunuh bakteri secara keseluruhan. Sel T berperan penting dalam eradikasi *Salmonella typhimurium*, terutama sel T CD4⁺. Penelitian membuktikan bahwa mencit dengan defisiensi sel T CD4⁺ gagal mengontrol infeksi, sehingga dapat berkembang menjadi penyakit kronik.⁵

Sel T CD8⁺ diketahui juga berperan dalam eradikasi *Salmonella*. Antigen protein berikatan dengan molekul MHC kelas I pada permukaan sel yang terinfeksi. Ikatan ini memicu aktivasi sel T CD8⁺.³³ Sel T CD8⁺ melakukan *killing* terhadap sel yang terinfeksi dengan cara melepas lytic granula (perforin, granzymes) atau dengan induksi produksi (FasL) atau TNF- α , yang akan berikatan dengan reseptornya dan memulai suatu kaskade bunuh diri sel menuju apoptosis sel sasaran.²¹

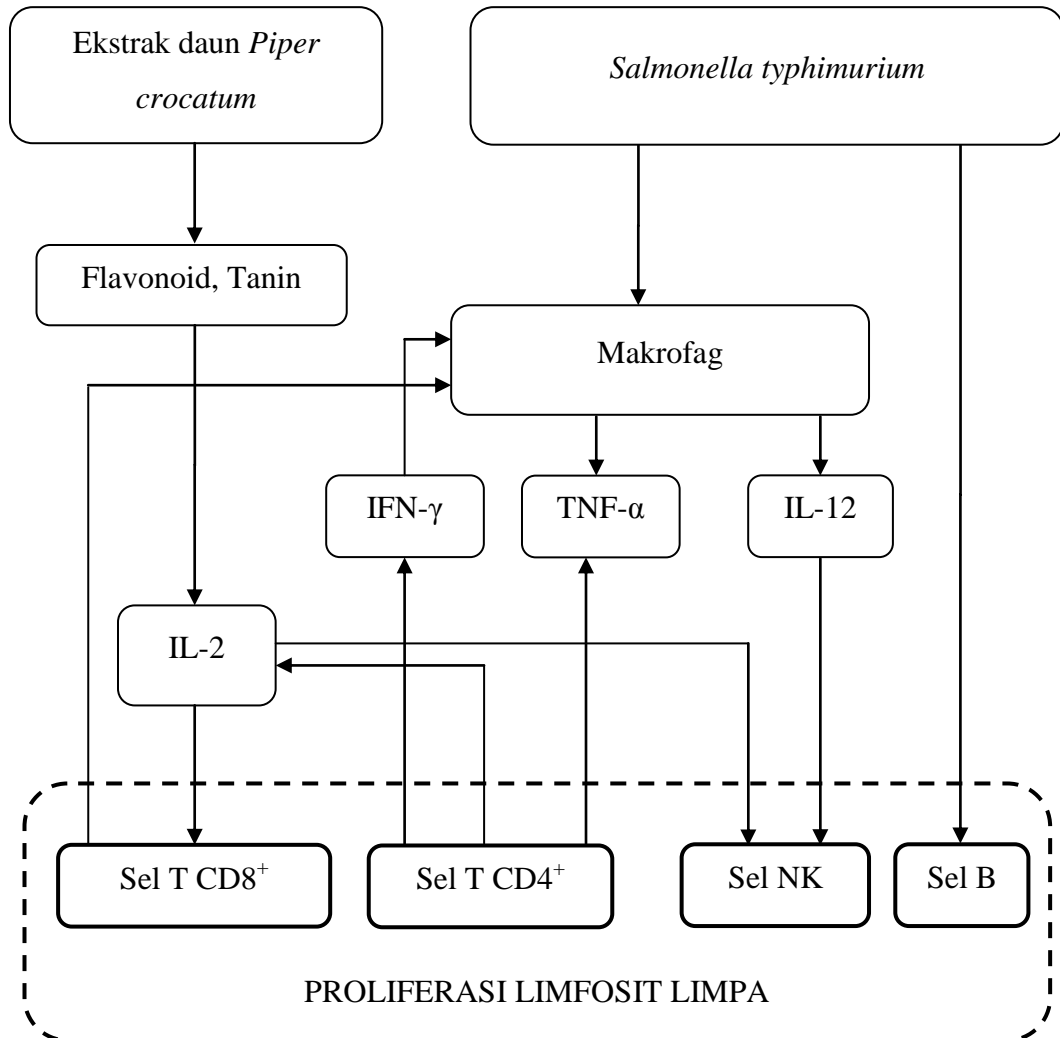
Berbeda dengan bakteri intraseluler lainnya, antibodi berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi *Salmonella*. Antibodi berperan dalam berbagai

fase infeksi Salmonella. IgM dan IgA dapat mencegah penetrasi Salmonella pada epitel usus, diperkirakan melalui penghambatan adhesi bakteri pada sel epitel dan sel M. Antibodi juga diketahui dapat menetralkan komponen toksik Salmonella seperti LPS.⁵

2.6 Efek sirih merah terhadap sistem imun

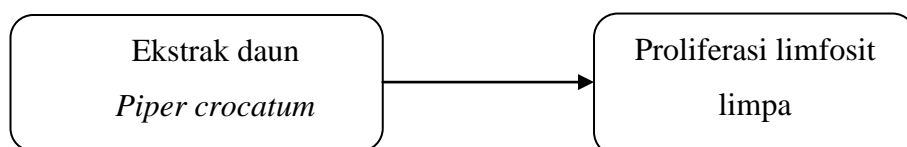
Sirih merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin. Flavonoid diketahui dapat mempengaruhi respon imun, salah satunya dengan cara mengaktivasi sel NK untuk merangsang produksi IFN- γ .³⁴ IFN- γ akan mengaktivasi makrofag dan meningkatkan aktivitas bakterisidalnya.³² Selain itu, diketahui bahwa senyawa flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit.³⁵ IL-2 sendiri berperan penting dalam proliferasi sel T dan sel B serta mempengaruhi fungsi makrofag dan sel NK.²³ Tanin sebagai efek imunomodulator berperan dalam meningkatkan aktivasi limfosit melalui induksi IL-2R α .¹⁸ IL-2R merupakan reseptor IL-2 yang berperan dalam aktivasi limfosit. Ikatan antara IL-2 dan IL-2R akan memicu proliferasi limfosit.²³

2.7 Kerangka teori



Gambar 5. Kerangka Teori

2.8 Kerangka konsep



Gambar 6. Kerangka Konsep

2.9 Hipotesis

2.9.1 Hipotesis Umum

Terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dosis bertingkat terhadap proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

2.9.2 Hipotesis Khusus

1. Terdapat perbedaan proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* antara kelompok yang diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 10 mg/hari/mencit dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak daun sirih merah.
2. Terdapat perbedaan proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* antara kelompok yang diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 30 mg/hari/mencit dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak daun sirih merah.
3. Terdapat perbedaan proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* antara kelompok yang diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 100 mg/hari/mencit dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak daun sirih merah.
4. Terdapat perbedaan proliferasi limfosit limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* antar kelompok perlakuan dengan masing-masing dosis.