

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN SUJI (*PLEOMELE ANGUSTIFOLIA* N.E. BROWN) TERHADAP VIABILITAS SEL LIMFOSIT PADA KULTUR PBMC YANG DIPAPAR H_2O_2 3%

Apolonia Berenika Badu, I.G.K Nyoman Arijana,
1Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana
Apollonia01@gmail.com,

ABSTRAK

Efek berbahaya radikal bebas semakin meningkat akhir-akhir ini akibat adanya *global warming* dan konsumsi makanan yang tidak sehat, oleh karena itu diperlukan suatu strategi untuk mengurangi atau meminimalisir efek tersebut. Salah satu strategi tersebut adalah perlunya suatu zat yang dapat mengurangi efek oksidatif dari radikal bebas dan dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh dengan melindungi dan meningkatkan viabilitas sel limfosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) terhadap viabilitas sel limfosit pada kultur PBMC yang dipapar H_2O_2 3%. Rancangan penelitian ini adalah eksperimental murni dengan *randomized post test only control group design*. Sampel yang digunakan adalah sel limfosit pada kultur PBMC sebanyak 594×10^2 sel/ml. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun suji, variabel terikat adalah viabilitas jumlah sel limfosit. Data dianalisis dengan *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Pada konsentrasi 0,00032 gr/ml, setelah pengamatan selama 30 menit, rata-rata viabilitas jumlah sel limfosit sebesar 94,62%. Uji *One Way ANOVA* memperoleh hasil *p value* = 0,02 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik terhadap viabilitas sel limfosit dari perlakuan antara kelompok yang diteliti. Hasil analisis *Post Hoc* memperoleh hasil terdapat perbedaan yang signifikan pada P0 dan P1, P1 dan P2, P1 dan P3, P1 dan P4, ($p < 0,005$). Ekstrak etanol daun suji efektif dalam meningkatkan viabilitas jumlah sel limfosit dibandingkan dengan kontrol positif. Konsentrasi 0,00032 merupakan konsentrasi yang paling efektif. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang sama banyak untuk setiap perlakuan.

Kata kunci: ekstrak etanol, daun suji, sel limfosit, H_2O_2

ABSTRACT

Currently the dangerous effects of free radicals more increased by the presence of global warming and consumption of unhealthy foods, then we need a strategy to reduce or minimize these effects. One of the strategies is the need for a substance that can reduce oxidative effects of free radicals and can increase the body's immune system to protect and improve the viability of lymphocytes. This study aimed to determine the effect of Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) leaf ethanol extract on lymphocytes in PBMC cultures were exposed to H_2O_2 3%. The design of this study is purely experimental with randomized post test only control group design. The samples used were lymphocytes in PBMC cultures as much as 594×10^2 cells/ml. The independent variable in this study is the concentration of the Suji leaf ethanol extract, the dependent variable is the lymphocyte viability. Data were analyzed by *One Way ANOVA* followed by *Post Hoc* test. At a concentration of 0.00032 g/ml, after observation for 24 hours, the average number of lymphocyte viability

was 94.62%. One Way ANOVA test obtain the results of the p value = 0.002 ($p < 0.05$), which means that there was a statistically significant difference on the viability of lymphocytes of treatment between the groups studied. Results of Post Hoc analysis there were significant differences in P0 and P1, P1 and P2, P1 and P3, P1 and P4 ($p < 0.005$). Suji leaf ethanol extract is effective in increasing the viability of the lymphocyte cell counts compared with the positive control. The concentration of 0.00032 is the most effective concentration. Further study is needed with the same lot number of samples for each treatment.

Keywords : ethanol extract, leaf suji, lymphocytes, H_2O_2

PENDAHULUAN

Sistem imun merupakan sistem interaktif kompleks dari gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi infeksi dengan bekerja sama melalui proses identifikasi dan eliminasi mikroorganisme patogen dan zat-zat berbahaya lainnya yang masuk ke dalam tubuh.¹

Radikal bebas diartikan sebagai molekul yang relatif tidak stabil, dapat bereaksi dengan molekul lain sehingga mengubah formasi atau struktur senyawa yang berinteraksi dengan radikal bebas, serta menimbulkan reaksi berantai yang sangat destruktif.² Peningkatan produksi radikal bebas yang melebihi kemampuan sistem antioksidan endogen untuk mempertahankan homeostasis redoks, akan menyebabkan keadaan yang disebut dengan stres oksidatif.³ Dalam keadaan stres oksidatif baik intrinsik maupun ekstrinsik, terjadi peningkatan ROS yang mengakibatkan ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan. Kondisi ini mengarah ke berbagai bentuk kerusakan mikro dan makromolekul. Akibatnya akan memberikan kontribusi ke dalam berbagai jenis manifestasi penyakit seperti anemia sel sabit, aterosklerosis, penyakit Parkinson, gagal jantung, infark miokard, penyakit Alzheimer, skizofrenia, kanker dan lainnya.⁴

Sel yang terpapar hidrogen peroksida (H_2O_2) akan terstimulasi oleh berbagai *signaling pathway* yang memicu hipersekresi mukus seperti *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) pada studi *invitro dan in vivo*. Hipersekresi mukus secara tidak langsung juga dipengaruhi oleh aktivasi dan rekrutmen sel inflamasi seperti netrofil serta stress oksidatif sel epitel pernafasan.⁵

Secara biologis, tubuh memiliki sistem antioksidan untuk menetralkan ROS yang dihasilkan oleh stres oksidatif. Sistem antioksidan seluler (AoEs) terdiri dari katalase, glutathione tereduksi (GSH), glutathione peroxidase (GPx), dan lain - lain. AoEs secara biologis berfungsi untuk menetralkan atau menghilangkan ROS. Jika terjadi kegagalan akan berkontribusi pada manifestasi penyakit.

Untuk manajemen efektif dari spesies reaktif, dilakukan beberapa penelitian pada tumbuhan dan senyawa sintesis seperti BHT dan BHA sebagai sumber potensial antioksidan.⁴

Mengingat efek berbahaya dari radikal bebas yang semakin meningkat oleh adanya *global warming*, pola konsumsi makanan yang tidak sehat, maka diperlukan suatu strategi untuk mengurangi atau meminimalisir efek tersebut. Salah satu strategi tersebut adalah perlunya suatu zat yang dapat mengurangi efek oksidatif dari radikal bebas dan dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh dengan melindungi dan meningkatkan jumlah sel limfosit.

Saat ini, pemberdayaan tanaman sebagai bahan baku obat-obatan gencar dilakukan. Di Indonesia banyak terdapat berbagai tanaman yang dapat dijadikan bahan baku obat-obatan. Tanaman Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) banyak tumbuh di Indonesia dan secara tradisional, bagian daunnya secara turun temurun digunakan sebagai pewarna hijau alami untuk pangan. Daun Suji mengandung klorofil dan mempunyai sifat antioksidan.⁶

Berdasarkan tinjauan pustaka, belum ada data lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak etanol daun Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) terhadap jumlah sel limfosit dengan paparan H_2O_2 . Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh dari ekstrak etanol daun Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) terhadap jumlah sel limfosit dengan paparan H_2O_2 secara *in vitro*.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan gambaran berharga mengenai pengaruh ekstrak etanol daun suji, sehingga dapat dijadikan acuan untuk penggunaan selanjutnya dalam pemanfaatan daun Suji sebagai obat.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design* (RPTOCD).

Prosedur penelitian meliputi tahap pembuatan ekstrak etanol daun Suji, tahap isolasi dan proliferasi sel limfosit, tahap uji

toksisitas akut dan tahap perlakuan. Pembuatan ekstrak daun Suji dilakukan dengan metode maserasi, yaitu dengan mencuci dan memotong daun Suji, kemudian dikeringkan di tempat teduh dengan suhu kamar (24⁰C) atau menggunakan AC dengan mode *dry* suhu 24⁰C selama 2 minggu. Daun suji yang telah kering sebanyak 45,6 gram kemudian dihancurkan hingga berbentuk serbuk. Kemudian serbuk daun suji ditimbang untuk mengetahui berat bersih setelah dikeringkan. Kemudian dimaserasi menggunakan pelarut etanol 95% hingga jenuh selama satu minggu. Setelah itu, rendaman disaring dengan corong gelas yang telah dilapisi kertas saring. Kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporation* sehingga didapatkan ekstrak etanol daun suji yang pekat.

Pada tahap isolasi dan proliferasi limfosit, darah vena sebanyak 5 ml diambil dari pembuluh darah perifer, kemudian diberikan antikoagulan heparin. Setelah itu diambil bagian *buffy coat* dan ditambahkan PHA dan FBS, kemudian didiamkan selama 3 hari. Selanjutnya dicat dengan menggunakan *trypan blue* dan dihitung jumlah proliferasi sel limfosit dengan menggunakan rumus : $N_{\text{sel mati}} = A \times FP \times D \times 10^4 \text{ sel/ml}$.

Ekstrak etanol daun Suji sebesar 0,032 gram diencerkan dengan aquades sampai mencapai 1000 μl dan dilarutkan menggunakan Tween 20% sebanyak 10 μl . Setelah ekstrak diencerkan, diambil konsentrasi 10 μl , 50 μl dan 100 μl . Kemudian disiapkan sumur uji sebanyak 4 plat uji, dan dimasukkan medium yang berisi *Phosphat buffer saline* (PBS) sebanyak 979 μl dalam 3 plat uji dan masukkan 980 μl PBS ke dalam sumur keempat sebagai kontrol. Setelah itu sel limfosit ditambahkan pada masing-masing sumur sebanyak 20 μl dan hasil pengenceran ekstrak daun suji sebesar 1 μl . Kemudian sumur dimasukkan ke dalam *incubator* dan

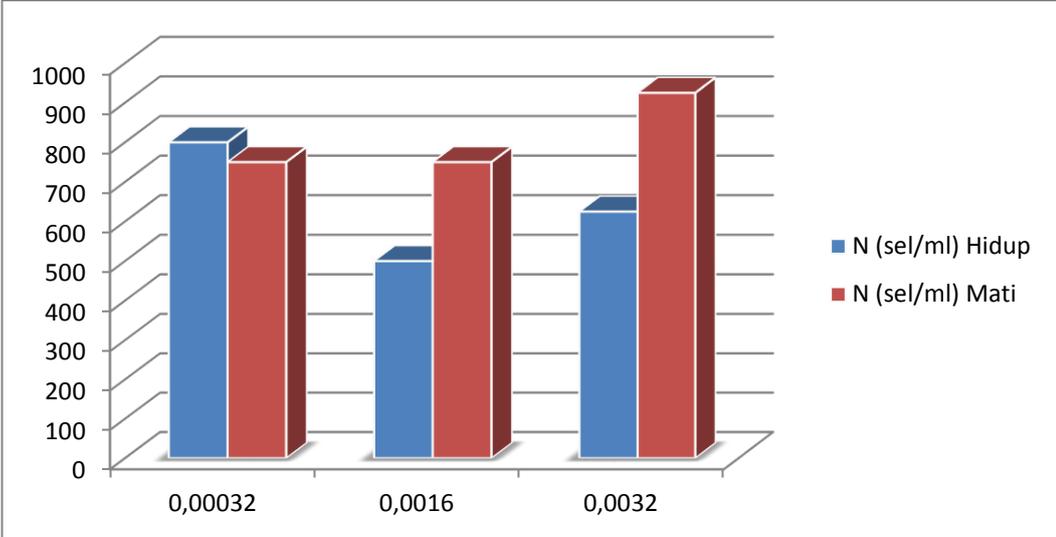
didiamkan selama 24 jam. Setelah 1 x 24 jam, sel limfosit sebanyak 40 μl diambil dari masing-masing sumur dan dicat dengan pewarna *trypan blue* sebanyak 10 μl . Selanjutnya diambil sebesar 6 μl pada masing-masing perlakuan ke dalam kamar hitung, untuk dihitung jumlah sel limfosit yang hidup dan mati.

Setelah perhitungan jumlah sel limfosit dan uji toksisitas akut, kemudian dilakukan pembagian sel limfosit sebanyak 10 μl pada masing-masing kelompok. Pada kelompok P0 terpapar PBS IX sebesar 5 μl dan ditambahkan medium RPMI-1640 sebanyak 485 μl , kelompok P1 terpapar H₂O₂ 3 % sebesar 0,284 μl , sedangkan pada kelompok P2, P3, P4 mendapat paparan H₂O₂ 3% sebanyak 0,284 μl , 716 μl medium dan ekstrak etanol daun suji sebanyak 5 μl dengan 3 variasi dosis sekali perlakuan yaitu dengan konsentrasi 0,00008 gr/ml (P2), 0,00016 gr/ml (P3) dan 0,00032 gr/ml (P4). Kemudian didiamkan selama 30 menit di dalam *incubator*, selanjutnya diperiksa jumlah sel limfosit yang hidup dan mati dengan pengecatan *trypan blue*. Untuk mengetahui viabilitas sel limfosit, dapat menggunakan rumus : $\text{Viabilitas (\%)} = (n/N) \times 100\%$.

HASIL

Dari hasil uji toksisitas, pada konsentrasi ekstrak etanol daun suji 0,0032 g/ml diperoleh jumlah sel limfosit hidup 800 sel/ml dan jumlah sel limfosit mati 750 sel/ml. Pada konsentrasi 0,0016 g/ml diperoleh jumlah sel limfosit hidup 500 sel/ml dan jumlah sel limfosit mati 750 sel/ml. Sedangkan pada konsentrasi 0,0032 g/ml diperoleh jumlah sel limfosit hidup 625 sel/ml dan jumlah sel limfosit mati 925 sel/ml.

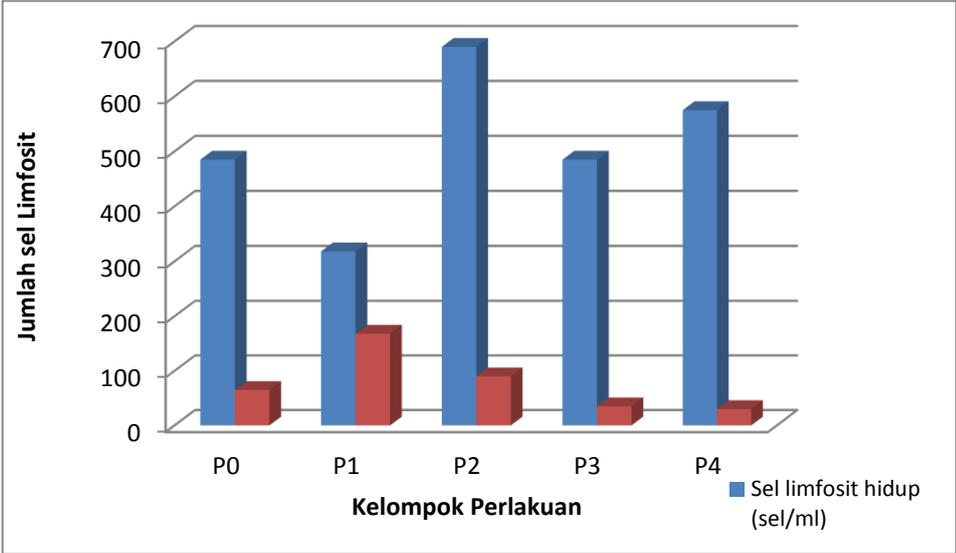
Dari hasil uji tersebut, dapat dikatakan bahwa konsentrasi ekstrak 0,0032 g/ml merupakan konsentrasi letal dose (LD₅₀).



Gambar 1. Grafik batang Uji Toksisitas Akut

Hasil penelitian jumlah sel limfosit yang hidup dengan pemberian ekstrak etanol daun suji menunjukkan bahwa viabilitas sel limfosit hidup tertinggi 94,62% terjadi pada konsentrasi 0,00032 g/ml yaitu 575 sel/ml dan sel mati sejumlah 30 sel/mati. Pada konsentrasi 0,00016

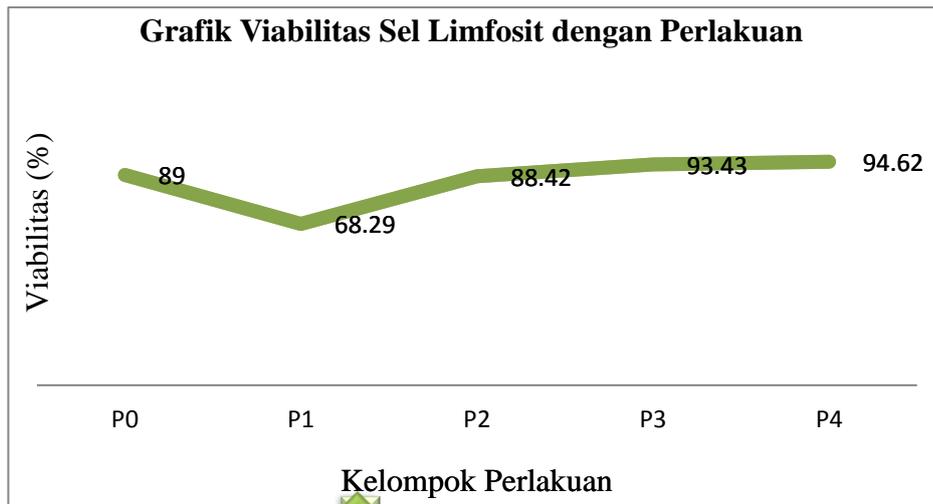
g/ml diperoleh 465 sel hidup/ml dan sel mati 40 sel/ml dengan viabilitas 93,43% sedangkan viabilitas terkecil sebesar 88,42% pada konsentrasi 0,00008 g/ml dengan sel limfosit hidup sejumlah 690 sel/ml dan sel mati 90 sel/ml



Gambar 2. Grafik batang jumlah sel limfosit hidup pada kelompok perlakuan

Keterangan :

- Kelompok P0:Perlakuan pada kelompok kontrol negatif berupa paparan PBS1X
- Kelompok P1:Perlakuan pada kelompok positif yang diberikan paparan H2O2 3%
- Kelompok P2: Perlakuan pada kelompok yang diberikan paparan H2O2 3 % dan ekstrak etanol daun suji dosis 0,00008 g/ml
- Kelompok P3 : Perlakuan pada kelompok yang diberikan paparan H2O2 3 % dan ekstrak etanol daun suji dosis 0,00016 g/ml
- Kelompok P4: Perlakuan pada kelompok yang diberikan paparan H2O2 3 % dan ekstrak etanol daun suji dosis 0,00032 g/ml



Gambar 3. Grafik Viabilitas Sel Limfosit dengan Perlakuan

Setelah perhitungan data secara deskriptif, dilanjutkan dengan pengolahan data secara statistik, yaitu : uji normalitas, uji homogenitas, uji *One-Way ANOVA* dan uji *Post-Hoc*.

Berdasarkan hasil uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* diperoleh hasil $p\text{ value} = 0.067$ ($p > 0.05$), yang menunjukkan bahwa data berdistribusi normal.

Setelah itu dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Test* untuk mengetahui varian data. Dari hasil uji, diperoleh nilai $p = 0,214$. Karena nilai $p > 0,05$ menunjukkan bahwa varians data adalah sama.

Selanjutnya dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan viabilitas pada masing-masing kelompok perlakuan. Dari hasil uji, diperoleh nilai $p = 0,002$ ($p < 0,05$) yang artinya bahwa terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik terhadap viabilitas sel limfosit dari perlakuan.

Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* yang merupakan kelanjutan dari uji *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan rerata viabilitas sel limfosit antara masing-masing kelompok perlakuan, dimana uji *Post Hoc* yang dilakukan adalah uji *Bonferroni*.

Dari hasil analisis uji *Bonferroni* diperoleh hasil bahwa antara perlakuan P0 dan P1 ($p=0,023$), P1 dan P2 ($p=0,028$), P1 dan P3 ($p=0,004$), P1 dan P4 ($p=0,002$) memiliki perbedaan rerata yang signifikan. P1 dan P4 mempunyai perbedaan rerata paling tinggi, yaitu $-26,05800$ yang artinya bahwa pasangan perlakuan tersebut memiliki perbedaan rerata viabilitas sel limfosit hidup yang signifikan

secara statistik. Jadi dapat dikatakan bahwa konsentrasi ekstrak pada perlakuan P4 lebih efektif dalam mempertahankan viabilitas sel limfosit terhadap paparan H_2O_2 dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak pada perlakuan lainnya.

PEMBAHASAN

Secara keseluruhan, viabilitas sel limfosit yang dipapar oleh ekstrak etanol daun suji lebih tinggi dibandingkan viabilitas sel pada kelompok yang hanya diberikan paparan H_2O_2 3%. Hasil rerata menunjukkan bahwa peningkatan rerata viabilitas jumlah sel limfosit berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun suji (*Pleomele angustidolia* N.E Brown) yang digunakan. Viabilitas jumlah sel limfosit tertinggi diperoleh pada konsentrasi P4. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun suji mampu melindungi sel dari apoptosis akibat paparan hidrogen peroksida. Hal ini diakibatkan karena kandungan klorofil dalam daun suji yang bermanfaat sebagai antioksidan. Dalam penelitian Prangdimurti dkk.⁶, disebutkan bahwa 'klorofil merupakan pemutus rantai yang bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas'. Hal ini sejalan dengan penelitian Endo dkk⁷, bahwa klorofil dilaporkan tidak memiliki kapasitas mendegradasi hidropersida ROOH, tetapi mempunyai kemampuan menangkap radikal peroksil ROO*. Hsu dkk⁸ menyatakan bahwa 'klorofil larut air, dalam hal ini feoforbida dan feoforbida b, memperkuat ketahanan limfosit

manusia terhadap kerusakan oksidatif yang diinduksi oleh H₂O₂. Kumar dkk⁹ mengatakan bahwa Klorofilin juga menghambat pembentukan radikal 2,2,6,6-tetrametilpiperidin oksida (TEMPO) dan menghambat oksidasi merah fenol yang diinduksi oleh H₂O₂. Klorofilin menangkap radikal hidroksil (hasil reaksi Fenton) sebelum menyerang sel. Dikatakan bahwa klorofil mampu menangkap H₂O₂ dengan kecepatan konstanta kecepatan reaksi antara klorofilin dengan H₂O₂ adalah sebesar 2.7 x 10⁶ M⁻¹.s⁻¹. Selain itu, dikatakan dalam Prangdimurti dkk.⁶ bahwa yang berperan dalam sifat antioksidatif klorofil adalah struktur porfirinnya dan kandungan antioksidan lain yang terkandung dalam ekstrak daun suji, seperti karotenoid dan komponen fenolik sehingga aktivitas antioksidannya tinggi.

Dari hasil analisis diperoleh bahwa konsentrasi ekstrak daun suji pada perlakuan P2 dan P3, yaitu sebesar 0,00008 gr/ml dan 0,00016 gr/ ml efektif dalam meningkatkan viabilitas sel limfosit dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif yang dipapar H₂O₂ (P<0,05). Dan diperoleh konsentrasi ekstrak daun suji yang paling efektif yaitu pada perlakuan P4, sebesar 0,00032 gr/ml.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun Suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) dapat meningkatkan viabilitas sel limfosit yang mendapat paparan H₂O₂ 3%. Viabilitas sel limfosit yang mendapat paparan H₂O₂ 3% lebih tinggi pada kelompok yang mendapatkan ekstrak etanol daun suji dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak etanol daun suji. Selain itu, dapat diketahui bahwa ekstrak daun Suji yang paling efektif dalam meningkatkan viabilitas sel limfosit adalah konsentrasi ekstrak daun suji sebesar 0,00032 gr/ml.

Saran-saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel sel limfosit yang sama untuk setiap kelompok perlakuan.
- 2) Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi ekstrak daun suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown) yang lebih bervariasi.
- 3) Disarankan untuk penggunaan MTT dalam penghitungan sel limfosit agar lebih akurat.

- 4) Sebelum pelaksanaan penelitian wajib dilakukan sterilisasi terhadap semua alat dan bahan untuk mencegah kontaminasi.

Daftar Pustaka

1. Guyton, A.C., & Hall, J.E.. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi ke-11. Jakarta : EGC. 2008; 439-440, 455 – 462.
2. Droge, W. *Free Radical in The Physiological Control of Cell Function. Journal Physiology Rev.* 2002; 82:47
3. Tilak, J.C. dan Devasagayam, D.P.A. *Oxidative Damage to Mitochondria. In: Singh, K.K., editor. Oxidative Stress, Disease and Cancer.* Singapura: Mainland Press. 2006; p.85.
4. Hussain A., Ramte A. *Flower extract of Nyctanthes arbor-tristis modulates glutathione level in hydrogen peroxide treated lymphocytes.* 2012
5. Xiao, J., Wang, K., Feng, Y.L., Chen, X.R., Xu, D., and Zhang, M.K. *Role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in cigarette smoke-induced mucus hypersecretion in a rat model. Chinese medical journal.* 2011; 124: 3327-3333.
6. Prangdimurti, Endang. *Kapasitas Antioksidan dan Daya Hipokolesterolemik Ekstrak Daun Suji (Pleomele angustifolia N.E. Brown).* IPB Repository. 2007; p. 6 – 13, 25 – 27, 72 – 73
7. Endo Y., Usuki, T. Kaneda. *Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the antioxidant of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. JAOCS* 62 1985; 1387-1390
8. Hsu
9. Kumar S.S., T.P. Devasagayam, B. Bhushan, N.C. Verma. *Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. Free Radic Res* 2001; 35 (5) : 563-74