

Aktivitas Ekstrak Daun Kelor terhadap Respons Imun Humoral pada Mencit yang Diinfeksi *Salmonella typhi*

(ACTIVITY OF KELOR LEAF EXTRACT ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN MICE POST SALMONELLA TYPHI INFECTION)

Mohammad Hefni¹, Muhaimin Rifa'i², Widodo²

¹Mahasiswa Pascasarjana Jurusan Biologi, ²Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145, Jawa Timur
Telepon: +62-341-554403, 558866, Fax. +62-341-554403
Email: hefnis2bio@gmail.com, rifa123@ub.ac.id, dodot134@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) terhadap respons imun humoral pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhi*. Mencit dikelompokkan menjadi dua kelompok. Kelompok non-infeksi dan kelompok infeksi *S. typhi*. Pada masing-masing kelompok diberikan ekstrak daun kelor secara oral selama 20 hari dengan dosis yang berbeda, di antaranya kelompok kontrol (0 mg/kg BB), dosis 1 (14 mg/kg BB), dosis 2 (42 mg/kg BB), dan dosis 3 (84 mg/kg BB). Selanjutnya pada kelompok infeksi diinfeksi *S. typhi* sebanyak 10^8 sel. Respons imun humoral dapat diketahui dengan mengamati jumlah populasi sel limfosit B (B220) dan sel Th *naive* (CD4⁺CD62L⁺) dengan analisis *software* BD CellQuest Flowcytometri. Data hasil *flowcytometri* dianalisis menggunakan uji sidik ragam dua arah ($P < 0,05$), dengan SPSS 16.0 for Windows. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor dapat beraktivitas sebagai imunostimulator terhadap sel limfosit B (B220) dan sel Th *naive* (CD4⁺CD62L⁺), namun pemberian dengan dosis rendah (14 dan 42 mg/kg BB) lebih efektif dibandingkan dengan dosis tinggi (84 mg/kg BB). Bahkan, pemberian ekstrak daun kelor dengan dosis tinggi (84 mg/kg BB) dapat beraktivitas sebagai immunosupresor terhadap sel Th *naive*.

Kata-kata kunci : kelor (*Moringa oleifera*), *Salmonella typhi*, imunitas humoral

ABSTRACT

The aim of this research was to analyze the activity of kelor (*Moringa oleifera* Lam) leaf extract on humoral immune response in mice infected with *Salmonella typhi*. Mice were divided into two groups : non-infected and infected *S. typhi* groups. Each group was administered orally for 20 days with varied doses of kelor leaf extract i.e. dose (0 mg/kg BW), dose 1 (14 mg/kg BW), dose 2 (42 mg /kg BW), and dose 3 (84 mg /kg BW). Then all of the sample in infected groups were injected with 10^8 cells *S. typhi*. The humoral immunity responses were determined by observing the number of lymphoid B cell (B220) and naive The cell (CD4⁺CD62L⁺) by using software BD CellQuest Flowcytometry. The data were analysed using Two-Way ANOVA ($P < 0.05$), with SPSS 16.0 for Windows. The kelor leaf extract showed immunostimulatory activity by significantly improved the number of lymphocyte B cell (B220), and naive Th Cell (CD4⁺CD62L⁺) in mice infected with *S. typhi*. The lower doses (dose of 14 mg/kg BW, and 42 mg/kg BW) of kelor leaf extracts was more effective than the highest dose (84 mg/kg BW). On the other hand, the high dose showed immunosupresor activity on naive Teessor Th Cell. However, immunosupresor activity on naive Th cell was observed on the mice given the highest dose of extract.

Keywords : kelor (*Moringa oleifera*), *Salmonella typhi*, humoral immunity

PENDAHULUAN

Agen infeksi maupun non-infeksi banyak terdapat di lingkungan sekitar kita, yang setiap saat dapat menyerang jaringan inang. Agen infeksi tersebut dapat berupa bakteri patogen intraseluler, dalam jumlah tertentu dapat menginfeksi dan bermultiplikasi di dalam tubuh

yang akan menyebabkan penyakit serius pada hewan maupun manusia dalam keadaan *immunodeficiency*.

Salah satu bakteri patogen intraseluler adalah kelompok bakteri dari genus *Salmonella*. Menurut Zang *et al.*, (2008), *Salmonella* merupakan agen penyebab penyakit *salmonellosis*. Bakteri ini termasuk ke dalam

famili *Enterobacteriaceae*, berbentuk batang, berflagel (Pui *et al.*, 2011), termasuk dalam golongan bakteri gram negatif, dan bersifat anaerob fakultatif. Bakteri dari golongan *Salmonella* ini mampu menyerang hewan dan manusia dengan berbagai tingkat infeksi yang bervariasi, mulai infeksi ringan yang mengakibatkan diare sampai pada infeksi berat, misalnya demam tifoid (Deipen *et al.*, 2005). Infeksi berat tersebut disebabkan oleh spesies *S. typhi* (Deipen *et al.*, 2005). Gejala infeksi *S. typhi* dapat menyebabkan penyakit infeksi sistemik yang parah, serta juga dapat menyerang sel-sel inang, terutama menyerang dan bereplikasi dalam sel makrofag.

Salmonella mempunyai faktor virulensi utama berupa lipopolisakarida (LPS) (Torres *et al.*, 2000). Jika pertahanan sel-sel inang tidak mencukupi, maka infeksi yang ditimbulkan akan berdampak pada organ-organ vital seperti kelenjar limfe, hati, dan limpa (Eckmann *et al.*, 2001).

Pecegahan sedini mungkin perlu dilakukan untuk mengantisipasi adanya infeksi *S. typhi* dengan cara meningkatkan sistem imun baik humoral maupun seluler. Imunitas humoral diperankan oleh sel limfosit B yang berasal dari *hematopoietic stem cell* dan dimatangkan pada sumsum tulang. Sel limfosit B penting diketahui karena merupakan sel yang secara khusus membentuk antibodi berupa imunoglobulin-D (IgD), IgM, IgE, dan IgA. Diver *et al.*, (2001) menyatakan sel B mempunyai sinyal reseptor yang berupa B220 (CD45).

Proliferasi dan aktivasi sel limfosit B tidak terlepas dari peranan Sel T *helper* / sel Th (CD4) yang dapat membantu dalam mensekresikan sitokin. Sel Th dalam keadaan *naive* (tidak teraktivasi dengan antigen) dilengkapi dengan molekul adhesi pada permukaannya yang berupa L-selektin (CD62L). Molekul L-selektin (CD62L) hilang dari permukaan sel Th seiring dengan adanya antigen atau agen inflamasi, dan sebagai responsnya sel Th akan mensekresikan sitokin yang dapat membantu terhadap proliferasi dan aktivasi sel limfosit B (Morrison *et al.*, 2010).

Peningkatan imunitas dapat dilakukan dengan terapi pemberian obat-obatan herbal untuk meminimalisir adanya resistensi terhadap bakteri target. Obat-obatan herbal dapat berasal dari buah, sayur, maupun tanaman yang memiliki kandungan sebagai imunomodulator. Salah satu tanaman yang memiliki kandungan imunomodulator yaitu

kelor (*Moringa oleifera* Lam). Kelor termasuk dalam famili *Moringaceae*, banyak tersebar di negara yang beriklim tropis dan sub-tropis termasuk di Indonesia. Menurut Kasolo *et al.*, (2010) kandungan fitokimia daun kelor yang diekstraksi dengan air meliputi senyawa *gallic tannin*, *steroids*, *titerpenoid*, *flavonoid*, *saponin*, *antraquinones*, *catecol tannin*, *alkaloid* dan *reducing sugar*. Kandungan fitokimia kelor ini dapat bermanfaat dalam meningkatkan titer antibodi (Sudha *et al.*, 2010), meningkatkan konsentrasi leukosit, eritrosit, kadae *haemoglobin* (Hb), persentase neutrofil, bobot organ timus, dan limpa (Gupta *et al.*, 2010).

Berdasarkan fenomena tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun kelor terhadap respons imun humoral pada mencit yang diinfeksi *S. typhi*. Respons imun humoral dapat diketahui dengan cara mengamati komponen yang terlibat dalam proses proliferasi dan aktivasi sel limfosit B (B220) di antaranya jumlah sel limfosit B (B220) pada sumsum tulang dan sel Th *naive* (CD4⁺CD62L⁺) pada limpa.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-November 2012 di Laboratorium Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya Malang yang meliputi Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Biologi Molekuler, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

Populasi dan Sampel

Populasi sampel yang digunakan sebanyak 32 ekor mencit (*Mus musculus*) *pathogen free strain Deutschland Denken Yonken* (DDY) jenis kelamin betina dengan umur tujuh minggu dengan rata-rata bobot badan 26 gram. Sampel bakteri yang digunakan sebagai agen infeksi yaitu berupa *S. typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Karduluk, Kecamatan Paragaan, Kabupaten Sumenep, Madura.

Pengelompokan Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba berupa mencit sebanyak 32 ekor dibagi menjadi delapan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor. Mencit diaklimasi selama satu

minggu, selanjutnya dibagi menjadi dua sub-kelompok (kelompok infeksi dan non-infeksi). Pada masing-masing kelompok digunakan tiga variasi dosis, seperti disajikan pada Tabel 1.

Pemberian dan Ekstraksi Daun Kelor

Pemberian ekstrak daun kelor dilakukan secara oral satu kali sehari selama 20 hari sesuai dosis perlakuan menggunakan sonde. Volume pemberian ekstrak daun kelor sebanyak 100 μ L dengan tambahan pearly Na-CMC 0,05%.

Pembuatan ekstraksi daun kelor dilakukan dengan cara mengambil daun kelor yang sudah dewasa (3-5 dari pangkal atau batang utama), selanjutnya dicuci hingga bersih. Daun kelor yang sudah bersih dikeringanginkan dan diblender, hasil blender kemudian diayak sehingga didapatkan serbuk (simplisia). Lima gram simplisia dilarutkan dengan 50 mL aquades dan dilakukan maserasi selama 15 menit sambil sesekali diaduk. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flanel dan kertas saring dan akan didapatkan infus. Infus yang diperoleh ditambah aquades sampai mencapai 50 mL. Infus yang diperoleh merupakan hasil ekstraksi dengan konsentrasi 10 kali pengenceran, dan selanjutnya digunakan sesuai dosis perlakuan.

Injeksi *S. typhi*

Injeksi *S. typhi* dilakukan secara intrapretoneal pada hari ke-21 sebanyak 10^8 sel/mL setelah pemberian ekstrak daun kelor. Injeksi dilakukan dengan mengambil *S. typhi* dari biakan murni dibiakkan pada 20 mL medium *luria broth* (LB), diinkubasi sampai mencapai jumlah 10^8 sel/mL dengan melakukan perhitungan dengan *hemacytometer* setiap 1 jam. Setiap melakukan perhitungan jumlah sel/mL ditambahkan 1-4 tetes formalin 4% dan dilakukan dengan proses penghitungan bakteri dengan menggunakan *hemacytometer*, sampai mendapatkan konsentrasi sel bakteri 10^8 sel/mL. Selanjutnya dilakukan setrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Pelet yang diperoleh disuspensi dengan larutan NaCl fisiologis sebanyak 100 μ L. Suspensi tersebut diinjeksikan pada hewan coba secara intrapretoneal.

Uji Konfirmasi *S. typhi* dalam Darah Mencit

Konfirmasi keberadaan *S. typhi* di dalam darah dilakukan setelah 24 jam perlakuan

infeksi *S. typhi* untuk memastikan keberadaan bakteri setelah infeksi. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan mengambil darah mencit melalui pembuluh vena caudalis (ekor). Mula-mula mencit dimasukkan dalam penyungkup dan ekornya dioles dengan alkohol 70% untuk sterilisasi dan menghilangkan rasa nyeri. Selanjutnya ekor mencit dipotong + 2 mm dari ujung ekor. Tetesan darah yang keluar pertama kali diusap dengan *tissue*, selanjutnya ekor diurut dari pangkal hingga ujung secara perlahan. Tetesan darah ditampung dalam *microtube* yang telah disisi dengan antikoagulan hingga mencapai volume 50 μ L. Selanjutnya ditambah dengan larutan NaCl fisiologi steril sebanyak 450 μ L. Darah hasil isolasi kemudian ditanam pada media LB dan diinkubasi dalam inkubator shaker selama 24 jam pada suhu 37 °C, 120 rpm.

Hasil isolasi pada media LB kemudian diinokulasikan pada media selektif *Salmonella* yaitu media *Xylose-Lysine-Deoxycholate* (XLD). Pada medium ini, *Samonella* membentuk koloni dan menghasilkan warna hitam. Konfirmasi bakteri uji selanjutnya dilakukan dengan uji katalase. *Salmonella* akan menunjukkan positif katalase. Uji katalase ini dilakukan dengan mengambil satu ose biakan bakteri dan direaksikan dengan H_2O_2 yang sebelumnya ditetaskan pada kaca objek. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gelembung yang menunjukkan H_2O_2 telah dipecah oleh isolat bakteri tersebut menjadi H_2O dan O_2 dengan reaksi ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$).

Pembedahan dan Isolasi Sel

Mencit dikorbankan nyawanya pada hari ke-34 dengan cara dislokasi leher. Kemudian dilakukan pembedahan dengan penyayatan pada daerah abdomen mencit, selanjutnya dilakukan pengambilan organ limpa dan sumsum tulang untuk diisolasi selnya.

Isolasi sel dari sumsum tulang dilakukan dengan cara mengambil dari tulang femur, dan tibia. Tulang femur dan tibia pada mencit terlebih dahulu dibersihkan dari sisa jaringan otot yang menempel kemudian digelontor (*flushing*) dengan PBS menggunakan jarum 27 G. Selanjutnya dihomogenkan dengan cara *pipeting*. Hasil isolasi sel ditambah larutan PBS sampai mencapai volume 6 mL dan dimasukkan ke dalam tabung *falcon* untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5 menit. Isolasi sel dari organ limpa dilakukan dengan cara mengambil organ

limpa mencit yang sudah dibedah. Selanjutnya disuspensi dengan PBS. Sel-sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter dengan menggunakan *wire*. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5 menit. *Pellet* yang dihasilkan disuspensi dengan 1 mL PBS dan *dipipeting* untuk mendapatkan homogenat. Sebanyak 200 µL homogenat dipindahkan pada tabung mikrosentrifus baru dan ditambahkan 500 µL PBS. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 20°C. Hasil supernatan dibuang dan pelletnya ditambahkan antibodi untuk selanjutnya dianalisis dengan *flowcytometri*.

Penghitungan Jumlah Sel

Penghitungan jumlah sel dilakukan untuk mengetahui jumlah absolut sel pada masing-masing organ yang diambil dalam penelitian ini, yaitu sumsum tulang dan limpa. Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel hasil isolasi dalam PBS diwarnai dengan pewarnaan *evans blue*. Sel yang dihitung adalah sel hidup yang ditandai dengan tidak terwarnai oleh *evans blue*.

Suspensi sel hasil isolasi dihitung dengan pengenceran 10 X, dengan cara mengambil 10 µL dan dimasukkan ke dalam microtube, selanjutnya ditambahkan 90 µL *evans blue* dan dihomogenkan. Penghitungan sel dilakukan terhadap sel hidup yang terdapat pada 5 kotak sedang pada *haemocytometer* dengan menggunakan rumus:

$$\Sigma = \frac{n.FP}{0.02} = \dots\dots\dots \times 10^3 \text{ sel/mL}$$

Ket : Σ = Jumlah sel keseluruhan
 n = jumlah sel dari 5 bilik hitung
 FP= Faktor Pengenceran

Analisis *Flowcytometri*

Analisis *flowcytometri* dilakukan untuk mengetahui jumlah populasi sel limfosit B (B220) pada sumsum tulang dan sel Th *naïve* (CD4⁺CD62L⁺) pada limpa. Sel homogenat yang diisolasi dari sumsum tulang diinkubasi dengan antibodi *anti-mouse anti-B220 FITC conjugated*, dan sel homogenat hasil isolasi dari limpa diinkubasi dengan antibodi *rat anti-mouse anti-CD4 FITC conjugated* dan *rat anti-mouse anti-CD64L PE conjugated*. Masa inkubasi dilakukan selama 15 menit pada suhu 4°C. Penambahan sel-sel dengan antibodi dengan perbandingan 1:500. Sampel yang telah diinkubasi dengan

antibodi ditambahkan dengan 3 mL PBS selanjutnya ditempatkan pada *kuvet flowcytometri*. *Flowcytometri* diatur sesuai dengan parameter yang akan dianalisis.

Analisis Data

Analisis Data Hasil *Flowcytometri*.

Data hasil dari *flowcytometri* dianalisis dengan menggunakan *softwer* BD *cellquest Pro™*. Program diatur sesuai dengan pewarnaan dan jenis sel yang diidentifikasi. *Gated* dilakukan berdasarkan pola ekspresi sel yang terlihat dalam layar komputer.

Analisis Statistika. Data hasil analisa dengan menggunakan *softwer* BD *cellquest Pro™* selanjutnya ditabulasi dan dianalisis dengan menggunakan uji sidik ragam dua arah melalui program SPSS 16.0. Apabila $P < 0,05$, hal ini menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan, dan uji dilanjutkan dengan uji lanjut *Tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Populasi Sel limfosit B (B220) pada Sumsum Tulang

Hasil analisis *flowcytometri* terhadap persentase jumlah relatif sel limfosit B yang terdapat pada sumsum tulang disajikan pada (Gambar 1) dapat diketahui bahwa, terdapat peningkatan jumlah persentase relatif sel limfosit B220 pada sumsum tulang setelah perlakuan pemberian ekstrak air daun kelor dengan model infeksi maupun non infeksi *S. typhi*. Hal ini dapat dilihat pada dosis pemberian ekstrak dengan model non-infeksi, masing-masing dosis 14 mg/kg BB sebanyak 34,49%, dosis 42 mg/kg BB sebanyak 34,10%, dan dosis 84 mg/kg BB sebanyak 51,05% mempunyai angka persentase sel B220 lebih tinggi apabila dibandingkan dengan mencit normal atau kontrol (dosis 0 mg/kg BB) dengan 29,43%. Pada hasil persentase jumlah relatif sel B pada sumsum tulang pascapemberian ekstrak kelor dengan model infeksi menghasilkan nilai persentase yang meningkat. Pada dosis 14 mg/kg sebanyak 23,66%, dosis 42 mg/kg BB sebanyak 25,26%, dosis 84 mg/kg BB sebanyak 34,02% lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diinfeksi bakteri *S. typhi* yakni sebanyak 17,23%.

Jumlah persentase *flowcytometri* ini hanya menggambarkan jumlah persentase sel yang hanya mengeskpresikan B220 dari jumlah sel

yang terbaca pada alat flowcytometri yaitu sebanyak 10.000 sel/ sampel. Oleh karena itu, untuk mengetahui jumlah sel B220 di seluruh sumsum tulang dilakukan penghitungan absolut sel dengan cara menghitung sel dari hasil isolasi sel sumsum tulang dengan menggunakan hemasitometer.

Hasil perhitungan statistik terhadap jumlah absolut sel B220 yang ada pada sumsum tulang (Tabel 2 atau Gambar 2) dengan perlakuan pemberian ekstrak daun kelor dengan model non-infeksi mempunyai perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$) antar kelompok perlakuan. Pada pemberian kelor dengan dosis 14 mg/kg BB diperoleh 4.769.805 sel/mL, dosis 42 mg/kg BB diperoleh 5.617.594 sel/mL, dosis 84 mg/kg BB diperoleh 4.555.187 sel/mL. Jumlah populasi sel ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (dosis 0 mg/kg BB) sebanyak 2.817.864 sel/mL. Peningkatan ini dapat diindikasikan sebagai akibat aktivitas imunostimulator dari ekstrak daun kelor.

Peningkatan jumlah populasi sel B220 atau peran imunostimulator pada perlakuan pemberian ekstrak daun kelor dengan model non-infeksi ini diduga disebabkan oleh kandungan bahan aktif daun kelor berupa senyawa flavonoid yang dapat bertindak sebagai *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), sehingga dapat memicu proliferasi sel B (B220). Flavonoid dapat meningkatkan sekresi sitokin Inter Leukin-2 (IL-2) yang dapat bertindak sebagai faktor proliferasi dan diferensiasi. Middleton *et al.*, (2000) mengungkapkan, senyawa flavonoid dapat memicu aktivitas MAPK. *Mitogen Activated Protein Kinase* memicu terjadinya fosforilasi berbagai protein termasuk *protein transkripsi faktor* yang dibutuhkan dalam proses sintesis protein yang akan digunakan dalam proses siklus sel. Craxton *et al.*, (1998) menambahkan MAPK menginduksi terjadinya aktivasi *protein transkripsi faktor* dalam hal ini *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B). *Nuclear Factor Kappa B* merupakan faktor transkripsi yang dapat menstimuli proliferasi dan diferensiasi sel CD40 (B220) melalui mekanisme regulasi sitokin. Lebih lanjut Sashidhara *et al.*, (2007) mengungkapkan, kandungan ekstrak daun kelor berupa flavonoid secara independen mampu meningkatkan produksi sitokin seperti IL-2. Sitokin IL-2 berperan dalam memediasi berbagai macam proses biologi, termasuk berperan dalam pertumbuhan dan proliferasi sel limfosit.

Pada kelompok perlakuan model infeksi dikombinasikan dengan pemberian ekstrak daun kelor juga diketahui mempunyai perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$) antar perlakuan (Tabel 2 atau Gambar 2). Hasil penelitian dapat mengungkapkan jumlah sel B220 pada kelompok yang hanya diinfeksi *S. typhi* tanpa pemberian ekstrak daun kelor diperoleh 463.398 sel/mL. Hal ini menunjukkan penurunan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kombinasi perlakuan infeksi disertai pemberian ekstrak daun kelor, yakni pada dosis 14 mg/kg BB diperoleh 1.654.806 sel/mL, dosis 42 mg/kg BB diperoleh 1.522.386 sel/mL, dan dosis 84 mg/kg BB diperoleh 2.131.539 sel/mL.

Penurunan jumlah populasi sel B220 pada kelompok yang diinfeksi bakteri ini diduga disebabkan adanya agen infeksi *S. typhi* dengan melalui berbagai mekanisme. Penurunan ini akibat adanya proses migrasi sel B yang ada pada sumsum tulang menuju organ limfoid perifer sebagai proses homeostasis dalam mengatasi bakteri patogen *S. typhi*. Mekanisme penurunan sel pada sumsum tulang juga diduga dapat terjadi karena bakteri patogen *S. typhi* mampu menyebabkan piroptosis sel yang terinfeksi.

Adanya migrasi sel B menuju organ limfoid perifer dijelaskan oleh Cariappa *et al.*, (2007) bahwa, progenitor sel B pada sumsum tulang berkembang menjadi sel B matang akibat adanya rangsangan antigen. Seiring dengan puncak kematangannya, sel B mengekspresikan molekul imunoglobulin M (IgM) atau *B Cell Receptor* (BCR) pada permukaan membrannya untuk kemudian meninggalkan sumsum tulang menuju organ limfoid perifer. Khan *et al.*, (2010) menambahkan, migrasi limfosit-B ini terjadi secara normal sebagai upaya dari proses homeostasis dalam merespons adanya sinyal eksogen dalam hal ini *S. typhi*. Migrasi sel limfosit-B pada organ limfoid perifer secara normal hanya berkisar antara 10-15% dari keseluruhan jumlah sel limfosit-B pada sumsum tulang, namun pada kasus tertentu dapat mencapai 45%. Lebih lanjut Alberts *et al.*, (2008) mengungkapkan, migrasi limfosit-B pada jaringan limfoid perifer sebagai upaya adaptasi dan aktivasi sel B dalam merespons adanya antigen dengan cara memproduksi molekul antibodi melalui mekanisme diferensiasi menjadi sel plasma atau membentuk sel memori.

Mekanisme penurunan sel limfosit-B yang terjadi akibat adanya proses piroptosis dijelaskan

oleh Ashida *et al.*, (2011), adanya infeksi bakteri patogen seperti *S. typhi* akan dikenali pertama kali oleh sekelompok protein dalam sistem *innate immunity* yaitu dari golongan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang terdiri dari *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) dan *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs). Adanya respons PAMPs dan DAMPs dapat menginduksi terbentuknya inflammasom. Terbentuknya *inflammasom* ini memicu lepasnya sitokin pro-inflamasi di antaranya IL-1 β dan IL-18, disertai dengan terjadinya fragmentasi DNA dan pecahnya membran sel. Davis *et al.*, (2011) menambahkan piroptosis merupakan salah satu kematian sel yang terprogram akibat adanya agen inflamasi yang memediasi *inflammasom* dan aktivasi caspase-1.

Di sisi lain pemberian ekstrak daun kelor dengan model infeksi juga mampu meningkatkan populasi sel B220 bila dibandingkan dengan kontrol yang hanya diinfeksi *S. typhi* tanpa perlakuan pemberian ekstrak daun kelor. Hal ini karena kandungan senyawa aktif flavonoid selain mampu meningkatkan aktivitas IL-2, diduga dapat mengaktifkan sitokin lain dalam respons imun. Puig *et al.*, (2007) mengungkapkan bahwa, kandungan senyawa flavonoid selain meningkatkan aktivitas IL-2, flavonoid juga mampu mengaktifkan sitokin lainnya melalui bantuan sel Th di antaranya melalui aktivasi sel Th2 yang menghasilkan sitokin IL-4, IL-5, dan IL-10. Ramiro *et al.*, (2010) menambahkan, IL-10 dapat menekan sel Th1 sehingga mampu menekan sekresi TNF- α . Senyawa TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi yang disekresikan makrofag akibat adanya rangsangan antigen LPS *S. typhi*. Senyawa IL-4 selain aktivitasnya dalam memengaruhi diferensiasi sel B membentuk antibodi IgD dan IgE, IL-4 juga berperan dalam mengatur aktivasi Th1 maupun Th2, sehingga homeostatis sistem imunitas tetap dalam kondisi ambang batas normal.

Populasi Sel Th Naive (CD4⁺CD64L⁺) pada Limpa

Hasil analisis statistika terhadap jumlah absolut sel Th *naive* (CD4⁺CD64L⁺) pada organ limpa menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$) antar kelompok perlakuan (Tabel 2 atau Gambar 3). Pada kelompok dengan perlakuan pemberian ekstrak daun kelor dengan model non-infeksi jumlah sel CD4⁺CD62L⁺ pada

masing-masing kelompok perlakuan di antaranya pada dosis 14 mg/kg BB diperoleh 36.023.668 sel/mL, dosis 42 mg/kg BB diperoleh 46.232.524 sel/mL. Hal ini menunjukkan angka lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (dosis 0 mg/kg BB) yang diperoleh 35.385.386 sel/mL. Pada pemberian ekstrak dengan dosis tinggi (dosis 84 mg/kg BB) diperoleh 15.394.382 sel/mL, menunjukkan angka persentase lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, pemberian ekstrak daun kelor pada dosis 14 dan 42 mg/kg BB berperan sebagai aktivitas imunostimulator dengan mampu meningkatkan jumlah sel T *naive* pada limpa. Sedangkan pada dosis tinggi (dosis 84 mg/kg BB) dapat berperan sebagai immunosupresor terhadap jumlah sel T *naive* pada limpa.

Peran imunostimulator ini diduga diperankan oleh zat aktif ekstrak daun kelor berupa kalsium (Ca), flavonoid, dan saponin karena mampu menginduksi peningkatan ekspresi IL-2 yang berperan dalam peningkatan proliferasi sel Th. Menurut Chen *et al.*, (2003) proses proliferasi sel dapat diakibatkan oleh rangsangan eksogen dari bahan aktif suatu tanaman berupa Ca, flavonoid dan saponin. Senyawa-senyawa tersebut dapat menginduksi terjadinya sintesis *proto-oncogene* seperti halnya *c-fos* dan *c-myc*. *Proto-oncogene* ini merupakan gen regulatorik normal yang terlibat dalam pengaturan produksi dan proliferasi sel. Keterlibatan *proto-oncogene* dalam proses proliferasi yaitu dengan cara meningkatkan transduksi sinyal mitogen melalui peningkatan ekspresi IL-2. Senyawa IL-2 disebut sebagai "*T-lymphocyte growth factor*" karena berperan penting dalam faktor proliferasi sel-sel limfosit dengan cara mempromosikan siklus sel T dari fase G1 menuju fase S. Kresno (2003) menambahkan bahwa paparan IL-2 meningkatkan konsentrasi *cyclin D2* dan *cyclin E*, yaitu protein yang dapat mengaktifkan berbagai *cyclin-dependent kinase* (CDK) sehingga dapat meningkatkan proliferasi sel.

Aktivitas immunosupresor pada dosis tinggi ditandai dengan penurunan jumlah sel Th *naive* (CD4⁺CD62L⁺). Penurunan jumlah sel Th *naive* diduga diperankan oleh kandungan bahan aktif ekstrak daun kelor yang juga dapat berperan sebagai immunosupresor dengan cara menghambat proliferasi sel dalam hal ini sel Th *naive*. Menurut Wang *et al.*, (2007) senyawa yang bersifat ampifilik yang terkandung dalam ekstrak herbal (flavonoid dan saponin) diketahui dapat meningkatkan level *Cyclin-Dependent-*

Kinase (CDK) inhibitor yang berupa protein P27^{KIP}. Protein P27^{KIP} berperan penting dalam meregulasi proliferasi sel pada fase G0/G1 dengan menghambat kompleks G1 Cyclin-CDK. Adanya penghambatan pada kompleks ini akan mengakibatkan kompleks Cyclin-CDK tidak teraktivasi yang berdampak pada terganggunya fosforilasi protein retinoblastoma, sehingga siklus sel tidak dapat berlanjut pada fase selanjutnya dan proses proliferasi sel terhenti.

Pada kelompok kombinasi perlakuan pemberian ekstrak daun kelor dengan model infeksi *S. typhi* menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($P < 0,05$) terhadap jumlah sel Th *naive* (CD4⁺CD62L⁺) (Tabel 2 atau Gambar 3). Pada kelompok kontrol yang hanya diinfeksi *S. typhi* tanpa pemberian ekstrak daun kelor jumlah Th *naive* sebanyak 7.512.429 sel/mL, hal ini menunjukkan angka yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok infeksi yang dikombinasikan dengan pemberian ekstrak daun kelor yaitu pada dosis 14 mg/kg BB diperoleh 7.595.689 sel/mL, dosis 42 mg/kg BB diperoleh 12.726.433 sel/mL, dan dosis 84 mg/kg BB diperoleh 8.990.897 sel/mL.

Penurunan yang terjadi pada kelompok yang hanya diinfeksi bakteri ini, diduga karena *S. typhi* mampu mengaktifkan sel Th sehingga jumlah sel CD4 yang mengekspresikan molekul CD62L berkurang. Menurut Eckmann *et al.*, (2001) adanya infeksi *S. typhi* dengan antigen LPS yang dimilikinya akan menyebabkan aktivasi sel T maupun sel B dengan melibatkan TCR dan BCR. Sebagai responsnya sel Th menginduksi sitokin proinflamasi serta mengekspresikan molekul CD62L. Morrison *et al.*, (2010) menambahkan rilisnya CD62L pada sel Th menandakan adanya respons pergerakan sel T pada jaringan yang inflamasi akibat adanya antigen LPS *S. typhi*. Lebih lanjut Rifa'i (2010) mengungkapkan pada sel limfosit CD62L berfungsi untuk melakukan perlekatan dan *rolling* pada sel endotel di sepanjang pembuluh darah sebagai respons dari adanya antigen, sehingga dengan kondisi tersebut sel T akan kehilangan molekul CD62L.

SIMPULAN

Ekstrak daun kelor memiliki aktivitas sebagai imunomodulator, dengan mampu bertindak sebagai imunostimulator dan immunosupresor terhadap sel limfosit B dan sel Th *naive* pada mencit yang diinfeksi *S. typhi*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas masing-masing bahan aktif *Moringa oleifera* yang berperan dalam mempengaruhi ekspresi sitokin dan sistem imunitas humoral.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu penelitian ini hingga penelitian ini selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. 5th Ed. USA: Garland Science. Pp 63-66
- Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kabayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *Journal Cell Biology* 195(6): 931-942
- Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. 2007. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Journal Blood* 109(6): 2339-2345.
- Chen HL, Li DF, Chang BY, Gong LM, Piao X, Yi GF, Zhang, JX. 2003. Effects of lentinan on broiler splenocyte proliferation, interleukin-2 production, dan signal transduction. *Journal Poultry Science* 82: 760-766
- Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. 1998. p38 MPAK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *Journal of Immunology* 161: 3225-3236.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 29: 707-735
- Diepen AV, Gevel JSV, Koudijs MM, Ossendrop F, Beekhuizen H, Janssen R, Dissel JTV. 2005. Gamma irradiation or CD4⁺ T cell depletion causes reactivation of latent *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in C3H/HeN mice. *Journal Infection and Immunity* 75(3): 2857-2862

- Diver DJ, Williams MJ, Cool M, Stetson DB, Williams MG. 2001. Development and maintenance of a B220 memory cell compartment. *Journal of Immunology* 167 : 1393-1405
- Eckmann L, Martin F, Kagnof F. 2001. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Journal Microbes and Infection* 3 : 1191-1200
- Gupta A, Gautam MK, Singh RK, Kumar MV, Rao CV, Goel RK, Anupurba S. 2010. Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Journal of Experimental Biology* 48 : 1157-1160
- Kasolo JN, Bimenya GS, Ojok L, Ochieng J, Jasper WO. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plant Research* 4(9) : 753-757
- Khan WN, Shinnars NP, Castro I, Hoek KL. 2010. *Contemporary Immunology*. Miami USA. Humana Pres. Pp 88-95
- Kresno SB. 2003. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI. Pp 165-180
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Journal Pharmacol* 52 (4) : 673-751
- Morrison VL, Barr TA, Brown S, Gray D. 2010. TLR-Mediated loss of CD62L focuses B cell traffic to the spleen during *Salmonella typhimurium* infection. *Journal of Immunology* 185 : 2737-2746
- Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Hidayah N, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Shon R. 2011. *Salmonella* : a foodborne pathogen. *Review Article International Food Research Journal*. 18: 465-473
- Puig P, Pérez-Cano FJ, Santana CR, Castellote C, Pulido MI, Permanyer J, Franch M, Castell M. 2007. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Journal Experimental Immunology* 149 : 535-542.
- Ramiro E, Franch A, Castellote C, Cristina A, Pulido MI, Castell M. 2010. Effect of theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Journal of Nutrition* 93(10) : 859-866.
- Rifa'i M. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press. Pp 40-65
- Sashidhara KV, Rosaiah JN, Tyagi E, Shukla R, Raghur R, Rajendran SM. 2007. Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera* as potential anti-inflammatory and antinociceptive agents. *European Journal of Medical Chemistry* 10(07) : 1-16
- Sudha P, Asdaq SMB, Dhamingi SS, Chandrakala GK. 2010. Immunomodulatory Activity of Methanolic Leaf Extract Of *Moringa oleifera* In Animals. *Journal Pharmacol* 54(2) : 133-140
- Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiopoulus H, Fang FC. 2000. Antimicrobial action of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxidase synthase in experimental Salmonellosis. Effect on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* 192(2) : 227-236
- Wang JX, Tang W, Shi LP, Zhou R, Ni J, Fu YF, Yang YF, Li Y, Zuo JP. 2007. Investigated of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. *Journal of Pharmacology* 150 : 652-661
- Zang LX, Jeza, Vektor T, Pan Q. 2008. *Salmonella typhi* human pathogen to a vaccine vector. *Journal Review Cellular and Molecular Immunology* 5(2) : 91-97