

# Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Timus Mencit (*Mus musculus*)

Linda K. Dewi, Sri Widyarti, Muhaimin Rifa'i  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang  
Corresponding author : rifa123@ub.ac.id

## ABSTRAK

Imunomodulator merupakan suatu senyawa yang dapat mempengaruhi sistem imun humoral maupun seluler. Daun sirsak (*Annona muricata*) banyak dikenal sebagai tanaman berkhasiat obat karena mempunyai senyawa-senyawa aktif yang berperan sebagai agen imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun sirsak terhadap peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus mencit. Daun sirsak diekstrak dengan metode maserasi menggunakan etanol 95%. Ekstrak etanol daun sirsak dilarutkan dengan NaCMC 0.5%, diberikan pada mencit secara oral selama 2 minggu dengan dosis 0, 25, 50, dan 100 mg/kg BB. Sel limfosit diisolasi dari timus dan dilakukan perhitungan jumlah absolut sel dengan *Haemocytometer* dan sel T yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> menggunakan *flowcytometry*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak dapat meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus secara signifikan ( $p < 0.05$ ) pada dosis 25 mg/kg BB. Sel T CD4<sup>+</sup> mengalami peningkatan sebesar 75% (3.6 juta sel) dan sel T CD8<sup>+</sup> mengalami peningkatan sebesar 238% (3.1 juta sel).

**Kata kunci:** ekstrak etanol, daun sirsak, sel T CD4<sup>+</sup>, sel T CD8<sup>+</sup>

## ABSTRACT

Immunomodulator is a substance that can affect the humoral and cellular immune systems. Leaf of soursop (*Annona muricata*) is widely known as medicinal plants because it's active compounds that act as immunomodulatory agents. This study aimed to determine the effect of ethanol extract of soursop leaf to the number of T cells CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>. Soursop leaves were extracted by maceration using ethanol 95% for 3x24 hours and dried with rotatory evaporator. The extract was diluted with NaCMC 0.5%. Ethanol extract of soursop leaves is administrated to mice orally for 2 weeks at a dose of 0, 25 mg, 50 and 100 mg/kg BW. Thymocytes were isolated and calculated by *flowcytometry* and *haemocytometry*. The results showed that ethanol extract of soursop leaf can increase the number of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells significantly ( $p < 0.05$ ) at a dose of 25 mg/kg BW. CD4<sup>+</sup> T cells increased by 75% (3.6 million cells) and CD8<sup>+</sup> T cells increased by 238% (3.1 million cells).

**Keywords:** ethanol extract, soursop leaf, CD4<sup>+</sup>T cells, CD8<sup>+</sup>T

## PENDAHULUAN

Aktivasi sistem imun diperlukan untuk membantu tubuh terhadap bahan-bahan antigenik. Aktivasi sistem imun dapat distimulasi menggunakan imunomodulator [1]. Imunomodulator adalah substansi atau agen yang dapat membantu memperbaiki fungsi sistem imun terganggu. Agen imunomodulator berpengaruh terhadap perkembangan dan aktivasi sel T [2].

Bahan aktif dari tanaman diduga mempunyai kemampuan sebagai agen imunomodulator untuk terapi beberapa penyakit seperti kanker dan diabetes. Salah satu tanaman yang digunakan masyarakat untuk terapi adalah daun sirsak. Namun demikian, mekanisme daun sirsak sebagai imunomodulator belum pernah dikaji. Ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa flavonoid dari golongan flavonol [3, 4]. Flavonol merupakan ko-pigmen yang banyak tersebar luas di bagian daun [5]. Flavonol berpotensi sebagai imunostimulan karena mampu meningkatkan produksi IL-2 yang terlibat dalam

aktivasi dan proliferasi sel T [6]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun sirsak terhadap peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus mencit.

## METODE PENELITIAN

### Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) galur Swiss, umur 8 minggu, berat 20-25 g, dalam keadaan sehat dan tidak ada kelainan anatomis. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat Laik Etik No. 95-KEP-UB dari Komite Laik Etik Universitas Brawijaya Malang.

### Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

## Antibodi

Antibodi yang digunakan adalah FITC Rat Anti-Mouse CD4 Clone GK 1-5 (BD Pharmigen™) dan FITC Rat Anti-Mouse CD8 Clone S3-67 (BD Pharmigen™).

## Ekstraksi Daun Sirsak

Daun sirsak dicuci bersih, dikeringkan, dihaluskan dengan blender, dimaserasi menggunakan etanol 95% (1:3), dan didiamkan 3x24 jam pada suhu kamar. Hasil maserasi diuapkan dengan rotatori evaporator pada suhu 50-60°C. Hasil yang didapatkan dilarutkan dengan NaCMC 0,5% [7].

## Isolasi Organ Limfoid

Mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, dibedah untuk pengambilan timus. Homogenat timosit dipindahkan ke dalam *tube* dan disentrifugasi 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Pelet hasil sentrifugasi diresuspensi dengan 1 ml PBS steril dan digunakan untuk analisa menggunakan *Haemocytometer* dan *Flowcytometry*.

## Perhitungan Jumlah Absolut Sel Limfosit

Suspensi pelet timosit sebanyak 20 µl ditambah 80 µl *tryphan blue* dan dihitung menggunakan *haemocytometer* untuk mendapatkan jumlah absolut sel.

## Perhitungan Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>

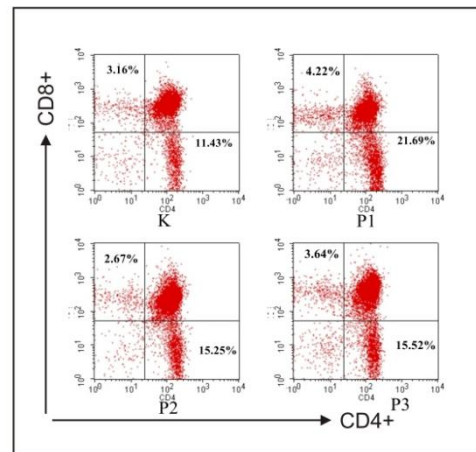
Pelet timosit diresuspensi dengan 50 µl antibodi (1:50) dalam PBS steril, kemudian dipindah ke dalam kuvet dan dipasang pada *nozzle flowcytometer* (BD FACS Calibur™). Dilakukan *setting* pada komputer dengan software *BD Cell Quest Pro™* dan dilakukan koneksi dengan *flowcytometer* (*acquiring mode*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

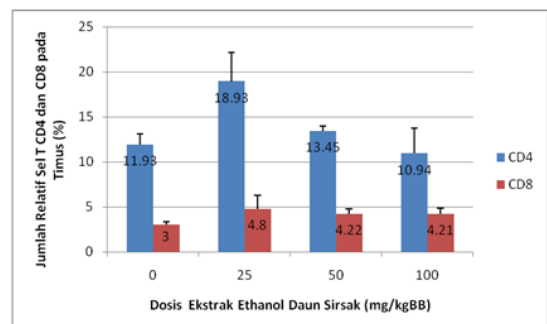
### Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Timus

Analisis jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak terhadap peningkatan sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Selain itu, jumlah relatif ini juga dipakai untuk memperkirakan kondisi mencit setelah perlakuan berdasarkan karakter sistem imunnya.

Jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> menunjukkan bahwa persentase jumlah relatif sel CD4<sup>+</sup> lebih tinggi jika dibandingkan dengan sel CD8<sup>+</sup> (Gambar 1 dan 2). Hal ini menunjukkan bahwa mencit yang mendapat perlakuan ekstrak etanol daun sirsak secara oral dalam kondisi sehat.



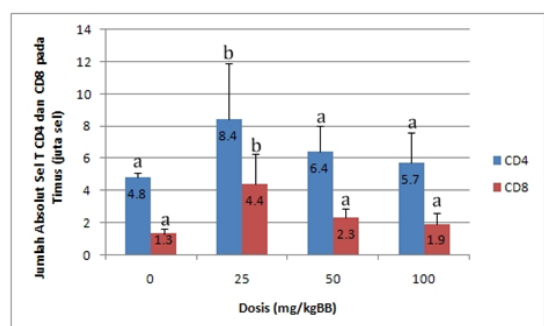
Gambar 1. Hasil analisa *flowcytometry* menunjukkan persentase jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus (K= Kontrol, P1= 25 mg/kg BB, P2= 50 mg/kg BB, P3= 100 mg/kg BB).



Gambar 2. Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus mencit setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak selama 2 minggu secara oral.

### Jumlah Absolut Sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Timus

Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> merupakan subset dari sel T yang mengalami pematangan di organ timus. Jumlah absolut sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus mengalami peningkatan secara signifikan ( $p < 0.05$ ) pada dosis 25 mg/kg BB (Gambar 3). Sel T CD4<sup>+</sup> mengalami peningkatan sebesar 75% (3.6 juta sel) dan Sel T CD8<sup>+</sup> mengalami peningkatan sebesar 238% (3.1 juta sel).



Gambar 3. Jumlah absolut sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> timus mencit setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak secara oral selama 2 minggu.

Peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> tersebut mengindikasikan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirsak bersifat imunostimulan. Hal ini diduga senyawa flavonol bersifat dalam daun sirsak menstimulasi peningkatan sintesis IL-2 sehingga terjadi aktivasi dan proliferasi sel T [6].

Senyawa-senyawa flavonol glikosida merupakan glikoprotein asal tanaman yang bersifat mitogenik. Mitogen adalah substansi yang menginduksi mitosis sel. Mitogen menginduksi timosit untuk meningkatkan transkripsi interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dan *tumor growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Induksi transkripsi IFN- $\gamma$  dan TGF- $\beta$  akan meningkatkan ekspresi reseptor sel T (TCR) yang matang [8]. Senyawa mitogenik juga menginduksi sintesis IL-2. Sel T yang terpapar mitogen akan meningkatkan ekspresi mRNA IL-2 dalam waktu 4 jam dan mencapai puncaknya setelah 12 jam. Selanjutnya, IL-2 akan menstimulasi proliferasi sel T [1].

Mekanisme kerja CD4<sup>+</sup> sebagai modulasi sistem imun jangka panjang antara lain melalui aktivasi dari beberapa sitokin yang mampu memfasilitasi perkembangan dan pematangan sel T CD8<sup>+</sup>. Sitokin tersebut antara lain IL-1, IL-2 dan IFN  $\gamma$  [9]. Peningkatan sel T CD4<sup>+</sup> berpengaruh terhadap aktivasi sel T CD8<sup>+</sup>. Respon CD8<sup>+</sup> ini akan semakin aktif dan fungsinya lebih optimal dengan adanya berbagai sitokin yang dilepaskan oleh sel T CD4<sup>+</sup> [10].

### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) dapat meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus secara signifikan ( $p < 0.05$ ) pada dosis 25 mg/kg BB. Sel T CD4<sup>+</sup> mengalami peningkatan sebesar 75% (3.6 juta sel) dan sel T CD8<sup>+</sup> mengalami peningkatan sebesar 238% (3.1 juta sel).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada kedua orang tua dan pembimbing (Ibu Dr. Sri Widyarti, M.Si dan Bapak Muhaimin Rifa'i S.Si, Ph.D.Med.Sc.). Antibodi yang dipakai dalam

penelitian ini disediakan oleh Bapak Muhaimin Rifa'i S.Si, Ph.D.Med.Sc.

### REFERENSI

1. Bellanti, J.A. 1993. **Immunologi III**. Georgetown University School of Medicine: Washington. D.C.
2. Baratawidjaya, K.G. 2000. **Imunologi Dasar**. Balai Penerbit FK UI. Jakarta.
3. Lai, J.H. 2002, Immunomodulatory effects and mechanisms of plant alkaloid tetrandrine in autoimmune diseases. *Acta Pharm Sin* 23(12): 1093-1101.
4. Takahashi JA, Pereira CR, Pimenta LP, Boaventura MA, Silva LG. 2006. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. *Nat Prod Res*. 20(1):21-26.
5. Ideasanti, Soetarno, S. & Kusmardiyani, S. 1995. Telaah Senyawa Fenolik Daun Sirsak, *Annona muricata* L., Annonaceae. Jurusan Farmasi ITB: Bandung. Tidak dipublikasikan
6. Ohashi, K., M. Mukai, P. Simanjutak & P. H. Shibuya. 2003. Cancer Cell Invasion Inhibitory Effects of Chemical Constituents in the Parasitic Plant *Scurrula artopurpurea* (Lorantaceae). *Chem Phar Bulletin* 51(3):343-345.
7. Lyu, S.Y. & Park, W.B. 2005. Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC *in vitro* incubation with flavonoids. *Arch. Pharm. Res.* 28, 573-581.
8. Adewole, S.O. & Ezekiel A.C.M. 2006. Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *African Journal of Biomed Research* 9: 173 – 187
9. Peters, B., Schneider-Stock R, Boltze C, Jäger V, Epplen J, Landt O, Rys J, & Roessner A. 2003. Elevated telomerase activity, c-MYC-, and hTERT mRNA expression: association with tumour progression in malignant lipomatous tumours. *J Pathol*, 199:517-525.
10. Zili, Z., Yi Liu, L. Wu. 2008. Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple echinacea species. *J. Med Foot* 18(4) 257-70.
11. Cheng T, Ting Chang, Sheng W, Po Jen, Ching Tai, & Angel C. 2006. Maintenance of CD8 effector T cells by CD4 Helper T cells eradicates growing tumors and promote long term immunity. *Journal of Science Direct* 24: 6199-207