

AKTIVITAS IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera* Lam TERHADAP POPULASI *HEMATOPOETIC STEM CELL* PADA MENCIT YANG DIINFEKSI *Salmonella typhi*

Mohammad Hefni, Muhaimin Rifa'i, dan Widodo

Laboratorium Fisiologi Hewan
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Email: hefnis2bio@gmail.com

Abstrak

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak daun *Moringa oleifera* Lam terhadap populasi Hematopoetic Stem Cell (HSC) pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhi*. Mencit dikelompokkan menjadi 2 kelompok. Kelompok non-infeksi dan kelompok infeksi *S. typhi*. Pada masing-masing kelompok diberikan ekstrak *M. oleifera* secara oral selama 20 hari dengan dosis yang berbeda, diantaranya 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. Jumlah populasi HSC dapat diketahui dengan mengamati molekul permukaan HSC (Cluster of Differentiation 34/ CD34) dengan analisa software BD CellQuest Flowcytometri. Data hasil flowcytometri dianalisis menggunakan Two-Way Anova ($P < 0.05$), dengan SPSS 16.0 for Windows. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak *M. oleifera* dapat beraktivitas sebagai imunostimulator terhadap HSC (CD34), namun pemberian dengan dosis rendah (14 dan 42 mg/kg BB) lebih efektif dibandingkan dengan dosis tinggi (84 mg/kg BB). Bahkan, pemberian ekstrak *M. oleifera* dengan dosis tinggi (84 mg/kg BB) dapat beraktivitas sebagai immunosupresor terhadap HSC

Kata kunci: *Moringa oleifera*, *Salmonella typhi*, Hematopoetic Stem Cell.

PENDAHULUAN

Agen infeksi maupun non-infeksi banyak terdapat di lingkungan sekitar kita, yang setiap saat dapat menyerang *host cell* maupun jaringan. Agen infeksi tersebut dapat berupa bakteri patogen intraseluler, dalam jumlah tertentu dapat menginfeksi dan bermultiplikasi di dalam tubuhyang akan menyebabkan penyakit serius pada hewan maupun manusia dalam keadaan *immunodeficiency*.

Salah satu bakteri patogen intraseluler diperankan oleh 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) dan termasuk dalam golongan bakteri gram negatif anaerob fakultatif. Bakteri dari golongan *Salmonella* ini mampu menyerang hewan dan

manusia dengan berbagai level infeksi yang bervariasi, mulai infeksi ringan yang mengakibatkan diare sampai pada infeksi tingkat tinggi seperti demam tifoid (Deipen *et al.*, 2005). Infeksi tingkat tinggi tersebut diperankan oleh spesies *Salmonella typhi* (Deipen *et al.*, 2005). Gejala infeksi *S. typhi* dapat menyebabkan penyakit infeksi sistemik yang parah, serta juga dapat menyerang sel-sel *host*, terutama menyerang dan bereplikasi dalam sel makrofag. *Salmonella* juga mempunyai faktor virulensi utama yang berupa lipopolisakarida (LPS) (Torres *et al.*, 2000). Jika pertahanan sel-sel *host* tidak mencukupi, maka infeksi yang ditimbulkan akan berdampak pada organ-organ vital termasuk pada sumsum tulang (*Bone marrow*), kelenjar gatah bening (*limph node*), dan limfa (*spleen*) (Eckmann *et al.*, 2001).

Pencegahan sedini mungkin perlu dilakukan untuk mengantisipasi adanya infeksi bakteri patogen (*S. typhi*) dengan cara

meningkatkan sistem imunitas baik humoral maupun seluler. Sel-sel imunitas yang berperan penting dalam sistem imunitas diperankan oleh *Hematopoeitic Stem Cell*(CD34) yang terdapat pada *bone marrow*. Sel pluripoten ini dapat membelah menjadi dua tipe *stem cell* yaitu limfoid progenitor dan mieloid progenitor yang berperan dalam meregulasi sistem imun baik humoral maupun selular.

Limfoid progenitor berkembang menjadi sel limfosit B dan T yang masing-masing berfungsi sebagai sistem imunitas humoral dan selular dalam sistem imunitas *adaptive*. Sedangkan mieloid progenitor berkembang sebagai leukosit, eritrosit, makrofag, dendritik, monosit, dan megakariosit yang memproduksi platelet yang penting dalam pembekuan darah (Hoffbrand, 2005).

Peningkatan imunitas ini 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 (memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun). Salah satu tanaman yang memiliki kandungan imunomodulator yaitu *Moringa oleifera*. *M. oleifera* 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 *M. oleifera* Lam meliputi senyawa *gallic tannin*, *steroids*, *titerpenoid*, *flavonoid*, *saponin*, *antraquinones*, *catecol tannin*, *alkaloid* dan *reducing sugar*, dan *alkaloid*. Kandungan fitokimia *M. oleifera* ini dapat bermanfaat dalam meningkatkan titer antibodi (Sudha *et al.*, 2010), meningkatkan konsentrasi leukosit, eritrosit, *haemoglobin level* (Hb), persentase neutrofil, berat organ timus dan spleen (Gupta *et al.*, 2010).

Berdasarkan fenomena tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak *M. oleifera* terhadap populasi *Hematopoeitic Stem Cell* pada mencit yang diinfeksi *S. typhi*. Populasi *Hematopoeitic Stem Cell* dapat diketahui dengan cara mengamati molekul permukaan CD (*Cluster of Differentiation*) dari HSC berupa CD34. Abbas (2005) mengungkapkan bahwa, CD34⁺ merupakan marker pertama yang dapat digunakan untuk mengetahui jumlah HSC primitif pada sumsum tulang atau darah perifer.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

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

Populasi dan Sampel

Populasi sampel yang digunakan sebanyak 8 perlakuan dengan 3 ulangan. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) pathogen freestrain *Deutschland Denken Yonken* (DDY) jenis kelamin betina dengan umur 7 minggu dengan rata-rata berat badan 26 gram. Sampel bakteri yang digunakan sebagai agen infeksi yaitu berupa *Salmonella typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Daun *Moringa oleifera* Lam yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari desa Karduluk, Kecamatan Paragaan, Kabupaten Sumenep.

Pengelompokan Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba berupa mencit sebanyak 32 ekor dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor. Mencit diaklimasi selama 1 minggu, selanjutnya dibagi menjadi dua sub-kelompok (kelompok infeksi dan non-infeksi). Pada masing-masing kelompok digunakan 3 variasi dosis yang berbeda **Tabel 1**.

Pemberian dan Ekstraksi *M. oleifera*

Pemberian Ekstrak *M. oleifera* dilakukan secara oral 1 kali sehari selama 20 hari sesuai dosis perlakuan menggunakan sonde. Volume pemberian ekstrak *M. oleifera* sebanyak 100 µl dengan tambahan pelarut Na-CMC 0.05%.

Pembuatan ekstraksi air daun *M. oleifera* dilakukan dengan cara mengambil daun *M. oleifera* yang sudah dewasa (3-5 dari pangkal atau batang utama), selanjutnya dicuci hingga bersih. Daun *M. oleifera* yang sudah bersih dikering anginkan dan diblender, hasil blender kemudian diayak sehingga didapatkan serbuk (simplicia). 5 gram simplicia 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, dandidapatkan infusa. Infusa yang diperoleh ditambah aquades sampai mencapai 50 ml. Infusa 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 *M. oleifera*. Injeksi dilakukan dengan mengambil *S. typhi* dari biakan murni dibiakkan pada 20 ml medium LB (Luria Broth), 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 PBS for injection atau NaCl fis sebanyak 100 µl. 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%. 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 diisi dengan antikoagulan hingga mencapai volume 50 µl. Selanjutnya ditambah dengan larutan NaCl fis steril sebanyak 450 µl. 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 XLD (*Xylose-Lysine-Deoxycholate*). Pada medium ini, *Salmonella* akan membentuk koloni dan akan 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 H₂O₂ yang sebelumnya diteteskan pada kaca objek. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gelembung yang menunjukkan H₂O₂ telah dipecah oleh isolat bakteri tersebut menjadi H₂O dan O₂ dengan reaksi ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$).

Pembedahan dan Isolasi Sel

Mencit dilakukan pembedahan pada hari ke-34. Mula-mula mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, hal ini memungkinkan mencit tidak merasakan sakit pada saat pembedahan. Kemudian dilakukan penyayatan pada daerah abdomen mencit, selanjutnya dilakukan pengambilan organ *bone marrow* untuk diisolasi selnya.

Isolasi sel dari *bone marrow* 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 diflush dengan PBS menggunakan jarum 27 G. Selanjutnya dihomogenkan dengan cara pipeting. Hasil isolasi sel ditambah 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. *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 *bone marrow* dan *spleen*. Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan haemocytometer. Suspensi sel hasil isolasi dalam PBS diwarnai dengan pewarnaan *evers blue*. Sel yang

dihitung adalah sel hidup yang ditandai dengan tidak terwarnai oleh *evens blue*.

Suspensi sel hasil isolasi dihitung dengan pengenceran 10 kali, dengan cara mengambil 10 µl dan dimasukkan ke dalam microtube, selanjutnya ditambahkan 90 µl even *Blue* dan dihomogenkan. Penghitungan sel dilakukan terhadap sel hidup yang terdapat pada 5 kotak sedang pada heamocytometer dengan menggunakan rumus:

$$\sum \frac{n.FP}{0.02} = \dots\dots x 10^3 \text{ sel/ml}$$

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

Analisis Flowcytometri

Analisis flowcytometri dilakukan untuk mengetahui jumlah populasi HSC(CD34) pada *bone marrow*. Sel homogenat yang diisolasi dari *bone marrow* diinkubasi dengan antibodi *rat anti-mouse anti-CD34PE conjugated*. Masa inkubasi dilakukan \pm 15 menit pada suhu 4°C. Penambahan sel homogenat dengan antibodi, digunakan perbandingan 1:500. Sampel yang telah diinkubasi antibodi ditambah dengan 3 ml PBS selanjutnya ditempatkan pada kuvet flowcytometri. Flowcytometri *disetting* sesuai dengan parameter yang akan dianalisis.

Analisis Data

Analisis Data Hasil Flowcytometri

Data hasil dari flowcytometri dianalisa dengan menggunakan sofwer 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 Statistik

Data hasil analisa dengan menggunakan sofwer BD cellquest Pro™ selanjutnya ditabulasi dan dianalisis dengan menggunakan uji statistik two-way ANOVA (*Analysis of Variance*) melalui program SPSS 16.0. apabila $P < 0,05$, hal ini menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan uji lanjut *Tukey*.

HASIL

Hasil rerata analisis flowcytometri pada (**Gambar 1**) menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak daun *M. oleifera* dengan model non-infeksi *S. typhi* dapat meningkatkan persentase CD34 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Terbukti pada P1(-) (dosis 14 mg/Kg BB) diperoleh persentase CD34⁺ sebanyak 3,19%, P2(-) (dosis 42 mg/Kg BB) 4,32%, dan P3(-) (dosis 84 mg/Kg BB) 2,96%, hal ini menandakan adanya peningkatan jumlah persentase CD34 apabila dibandingkan dengan kelompok K(-) (dosis 0 mg/Kg BB) 2,60%.

Pada perlakuan pemberian ekstrak air daun *M. oleifera* dengan model infeksi *S. typhi* (**Gambar 1**) menunjukkan hasil persentase yang relatif sama antar perlakuan, yakni pada K(+) (dosis 0 mg/Kg BB) persentase CD34 sebanyak 2,07%, P1(+) (dosis 14 mg/Kg BB) sebanyak 2,11%, P2(+) (dosis 42 mg/Kg BB) sebanyak 2,22%, dan P3(+) (dosis 84 mg/Kg BB) sebanyak 2,35%.

Jumlah persentase flowcytometri ini menggambarkan jumlah persentase sel yang hanya mengeskpresikan CD34 dari jumlah sel yang terbaca pada alat flowcytometri \pm 10.000 sel/ sampel. Oleh karena itu, untuk mengetahui jumlah sel CD34 di seluruh sumsum tulang/ *bone marrow* dilakukan perhitungan secara absolut sel dengan cara menghitung sel/ml dari hasil isolasi sel *bone marrow* dengan menggunakan hemacytometer.

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah absolut sel CD34 disajikan pada (**Tabel 2**) dapat diketahui bahwa, jumlah absolut sel CD34 pada perlakuan pemberian ekstrak air *M. oleifera* Lam dengan model infeksi dan non-infeksi *S. typhi* terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($P \text{ Value} < 0.05$).

Hasil uji lanjut menggunakan *Tukey* (**Gambar 2**) menunjukkan bahwa, pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak daun *M. oleifera* dengan model non-infeksi diketahui pada kelompok P1(-) (dosis 14 mg/kg BB) jumlah populasi sel CD34 667329 sel/ml dan P2(-) (dosis 14 mg/Kg BB) jumlah sel CD34⁺ sebanyak 1083753 sel/ml, menunjukkan jumlah lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok K(-) (dosis 0 mg/Kg BB) 591665 sel/ml. Namun pada kelompok P3(-) (Dosis 84 mg/kg BB) jumlah sel CD34 mengalami penurunan dibandingkan dengan K(-), yaitu 518571 sel/ml. Fenomena ini mengindikasikan adanya aktivitas

imunostimulator yang diperankan oleh ekstrak daun *M. oleifera* pada dosis rendah (14 dan 42 mg/kg BB), sedangkan dosis tinggi (84 mg/kg BB) pada penelitian ini bertindak sebagai immunosupresor.

Pada perlakuan pemberian ekstrak daun *M. oleifera* Lam dengan model infeksi *S. typhi* jumlah sel CD34 meningkat secara signifikan (**Gambar 2**). Jumlah sel CD34 pada masing-masing kelompok perlakuan P1(+) (dosis 14 mg/Kg BB) sebanyak 510413 sel/ml, P2(+) (dosis 14 mg/Kg BB) sebanyak 366723 sel/ml, dan P3(+) (dosis 84 mg/Kg BB) sebanyak 478882 sel/ml menunjukkan angka yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya diinfeksi *S. typhi* K(+)¹ 186274 sel/ml.

PEMBAHASAN

Sub-bab dalam penelitian ini akan membahas jumlah populasi sel induk pluripoten atau *Hematopoietic Stem Cells* (HSC) pada *bone marrow* setelah pemberian ekstrak air daun *Moringa oleifera* Lam dengan model non-infeksi dan infeksi *Salmonella typhi*. Populasi HSC penting untuk diketahui karena termasuk salah satu organ sentral limfoid yang berperan dalam sistem imunitas.

Penggunaan *M. oleifera* sebagai agen immunomodulator didasarkan pada kemampuannya dalam meregulasi sistem imunitas. Wiedosari (2007) mendefinisikan, immunomodulator merupakan substansi atau obat yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun. Immunomodulator dibagi menjadi 3 kelompok: i) immunostimulator, berfungsi untuk meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, ii) immunoregulator, artinya dapat meregulasi sistem imun, dan iii) immunosupresor yang dapat menghambat atau menekan aktivitas sistem imun.

Mekanisme kerja dari immunomodulator yaitu dengan cara mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu (immunorestorasi), memperbaiki fungsi sistem imun (immunostimulasi), dan menekan respon imun (immunosupresi). Immunomodulator digunakan terutama pada penyakit immunodefisiensi, infeksi kronis dan kanker. Pemberian immunostimulan atau immunomodulator sangat diperlukan untuk mencegah penghancuran sel T *helper* CD4⁺ pada pasien yang terinfeksi bakteri dan penderita kanker (Katzung, 1995).

Berdasarkan hasil penelitian inipemberian ekstrak *M. oleifera* dapat

bertindak sebagai immunomodulator. Pada dosis rendah (14 dan 42 mg/kg BB) mampu bertindak sebagai immunostimulator dengan mampu meningkatkan jumlah sel CD34 atau HSC. Sedangkan pada dosis tinggi (84 mg/kg BB) dapat bertindak sebagai immunosupresor dengan mampu menurunkan jumlah sel CD34 atau HSC.

Peningkatan jumlah populasi sel CD34 ini diduga disebabkan oleh kandungan bahan aktif dari ekstrak air daun *M. oleifera* yang berupa flavonoid, saponin dan Ca. Middleton *et al.* (2000) mengungkapkan, flavonoid dapat memicu aktivitas *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK). MAPK akan memicu terjadinya fosforilasi berbagai protein termasuk *protein transcription factor* yang dibutuhkan dalam proses sintesa protein dalam proses siklus sel. Craxton *et al.* (1998) menambahkan MAPK dapat menginduksi terjadinya aktivasi *protein transcription factor* dalam hal ini NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*). Sun (2010) menambahkan, NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang dapat bertranslokasi ke dalam nukleus dan dapat menginduksi lebih dari 200 gen anti-apoptosis termasuk protein Bcl-2 dan Bcl-XL. Adanya protein-protein tersebut dapat memungkinkan sel untuk tetap *survive* dan tetap mampu melakukan proliferasi sehingga jumlah sel meningkat.

Nuhu (2010) menambahkan, senyawa flavonoid, saponin, dan Ca dapat ditemukan pada ekstrak air daun *M. oleifera*. Chen *et al.* (2003) melaporkan senyawa flavonoid, saponin, dan Ca 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. *proto-oncogene* tersebut terlibat dalam meningkatkan konsentrasi *cyclin* D2 dan *cyclin* E, yaitu protein yang dapat mengaktifkan berbagai *cyclin-dependent kinase* (CDK) yang dibutuhkan dalam siklus sel. Peningkatan konsentrasi *cyclin* D2 dan *cyclin* E ini dapat meningkatkan aktivitas proliferasi sel CD34.

Aktivitas immunosupresor diperankan oleh ekstrak daun *M. oleifera* pada dosis tinggi (84 mg/kg BB) hal ini diduga disebabkan oleh salah satu kandungan bahan aktif ekstrak *M. oleifera* Lam yang berupa saponin dalam konsentrasi tinggi diduga mampu menyebabkan apoptosis sel sehingga jumlah CD34 berkurang. *Statement* ini sejalan dengan

Gao *et. al.*, (2011) bahwa, ekstrak *Paris chinensis* yang mengandung bahan aktif saponin dengan konsentrasi tinggi mampu meningkatkan permeabilitas membran mitokondria sehingga akan menyebabkan teraktivasinya protein yang dapat mengaktifkan caspase 9, yang didahului dengan pelepasan sitokrom c dari membran mitokondria menuju sitosol. Rilisnya sitokrom-c dan teraktivasinya caspase 9 selanjutnya akan memicu aktivasi caspase 3 yang dapat mengaktifkan ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*) diiringi dengan meningkatnya diterminasi sel, sehingga sel akan mengalami apoptosis. Banyaknya sel yang mengalami apoptosis dapat menurunkan jumlah sel CD34 atau HSC.

Menurunnya jumlah sel CD34 juga terjadi pada kelompok perlakuan dengan model infeksi, hal ini dapat dimungkinkan terlibat dalam beberapa mekanisme. Mekanisme apoptosis sel akibat adanya agen infeksi dari bakteri patogen atau juga dapat dimungkinkan karena pada perlakuan model infeksi *S. typhi* dapat memicu berdiferensiasinya HSC ke arah meiloid maupun ke arah limfoid dalam mengatasi antigen *S. typhi*. Weinrauch & Zychlinsky (1999) mengungkapkan, bakteri patogen seperti *S. typhi* dapat memicu terjadinya apoptosis pada *host cell* yang terinfeksi. Kemampuan *S. typhi* dalam menginfeksi diperankan oleh endotoksin LPS yang dimilikinya. LPS *S. typhi* dapat menekan ekspresi protein anti-apoptosis yang diperankan oleh golongan protein Bcl. Hilangnya protein anti-apoptosis akan berdampak pada terganggunya integritas membran mitokondria, yang akan berdampak pada terganggunya influks Ca, sehingga dapat memicu apoptosis sel.

Mekanisme penurunan jumlah sel CD34 yang lain akibat berdiferensiasinya sel CD34. Hal ini dijelaskan oleh Corolin *et al.* (2008) bahwa HSC akan mengalami proses diferensiasi dan akan kehilangan molekul CD34, sehingga kuantitas CD34 berkurang. HSC dengan salah satu fungsinya dapat membelah menjadi *stem cell* limfoid progenitor dan akhirnya berkembang menjadi sel limfosit B dan T. Hoffbrand (2005) menambahkan, pada tahap awal perkembangannya HSC akan berkembang menjadi progenitor sel T yang kemudian berkembang menjadi sel double negatif CD4⁻ CD8⁻, selanjutnya sel akan berkembang

menjadi single positif (CD4⁺ atau CD8⁺) tergantung pada reaksi TCR dengan kelas MHC. Jika TCR berikatan dengan MHC kelas I, maka akan memicu diferensiasi ke prekursor sel T sitotoksik (CD8⁺), sedangkan ikatan TCR dengan MHC kelas II akan memicu diferensiasi ke prekursor sel T helper (CD4⁺). Ikatan TCR dengan kelas MHC I atau II ditentukan oleh jenis antigen yang diproses oleh sistem imunitas.

Kesimpulan

Ekstrak daun *Moringa oleifera* Lam dapat bertindak sebagai imustimulator dengan mampu meningkatkan populasi HSC (CD34) pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhi*, namun pada pemberian ekstrak daun *M. oleifera* Lam dengan dosis rendah (14 dan 42 mg/kg BB) lebih efektif bila dibandingkan dengan dosis tinggi (84 mg/kg BB). Bahkan, pada dosis tinggi (84 mg/kg BB) dapat bertindak sebagai immunosupresor.

Acknowledgment

Penelitian ini didanai oleh **Muhaimin Rifa'i, Ph.D., Med. Sc.** dalam hal pengadaan hewan coba dan antibodi.

Daftar Pustaka

- Chen HL., Li DF., Chang BY., Gong, LM., Piao XS., Yi G.F., and 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 J.D., Saklatvala J., Krebs E.G., and Clark, EA. 1998.p38 MPAK is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes. *Journal of Immunology*. 161:3225-3236.
- Diepen AV., Gevel JSV., Koudijs MM., Ossendrop F., Beekhuizen H., Janssen R., and 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
- Eckmann L., Martin., and Kagnof F. 2001. Cytokines in Host Defense Against *Salmonella*. *Journal Microbes and Infection*. 3:1191-1200

- Gao L., Li FR., Jiao P., Yang MF., Zhou XJ., Si YH., Jiang WJ., and Zheng T. 2011. *Paris chinensis* Dioscin Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Gastric Cancer. *World Journal Gastroenterology*. 17(39): 4389-4395.
- Gupta A., Gautam MK., Singh RK., Kumar MV., Rao CV., Goel RK., and Anupurba S. 2010. Immunomodulatory Effect of *Moringa oleifera* Lam. Extract on Cyclophosphamide Induced Toxicity in Mice. *Journal of Experimental Biology*. 48: 1157-1160
- Hoffbrand AV., Pettit, JE., & Moss PA. 2005. *Hematology*. Jakarta,: EGC Kedokteran, 285-290.
- Kasolo JN., Bimenya GS., Ojok L., Ochieng J., and Jasper WO. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plant Research*. 4(9): 753-757
- Katzung BG. 1995. *Basic and Clinical Pharmacology*^{6thEd}. Prentice, Hall International Inc, 157.
- Middleton E., Kandaswami C., and Theoharides TC. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, dan Cancer. *Journal Pharmacol*. 52(4): 673-751.
- Nuhu F. 2010. Effect of *Moringa* Leaf Meal (MOLM) on Nutrient Digestibility, Growth, Carcass and Blood Indices of Weaner Rabbits. *Thesis*. Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, 87.
- Pui CF., Wong WC., Chai LC., Tunung R., Jeyaletchumi P., Hidayah N., Ubong A., Farinazleen MG., Cheah, YK., and Shon R. 2011. *Salmonella* : A Foodborne Pathogen. *Review Article International Food Research Journal*. 18: 465-473
- Sudha P., Asdaq SMB., Dhamingi SS., and Chandrakala GK. 2010. Immunomodulatory Activity of Methanolic Leaf Extract Of *Moringa oleifera* In Animals. *Journal Pharmacol*. 54(2): 133-140
- Sun OC. 2010. Studies of The Anti-Cancer Potential of Flavonoids in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Thesis*. Master of Science, National University of Singapore, Singapore, 53.
- Torres AV., Carson JJ., Mastroeni P., Ischiopoulus H., and 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
- Weinrouch Y and Zynchinsky A. 1999. The Induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens. *Annual Reviw of Microbiology*. 53(10): 155-187.
- Wiedosari E. 2007. Peranan Immunomodulator Alami (Aloe vera) dalam Sistem Imunitas Seluler dan Humoral. *Jurnal Wartazoa*. 17(4): 165-171
- Zang LX., Jeza, Vektor T., and Pan Q.. 2008. *Salmonella typhi* Human Pathogen to a Vaccine Vector. *Journal Review Cellular and Molecular Immunology*. 5(2): 91-97

Tabel 1. Pengelompokan Dosis dan Model Faktor Perlakuan terhadap Hewan Coba

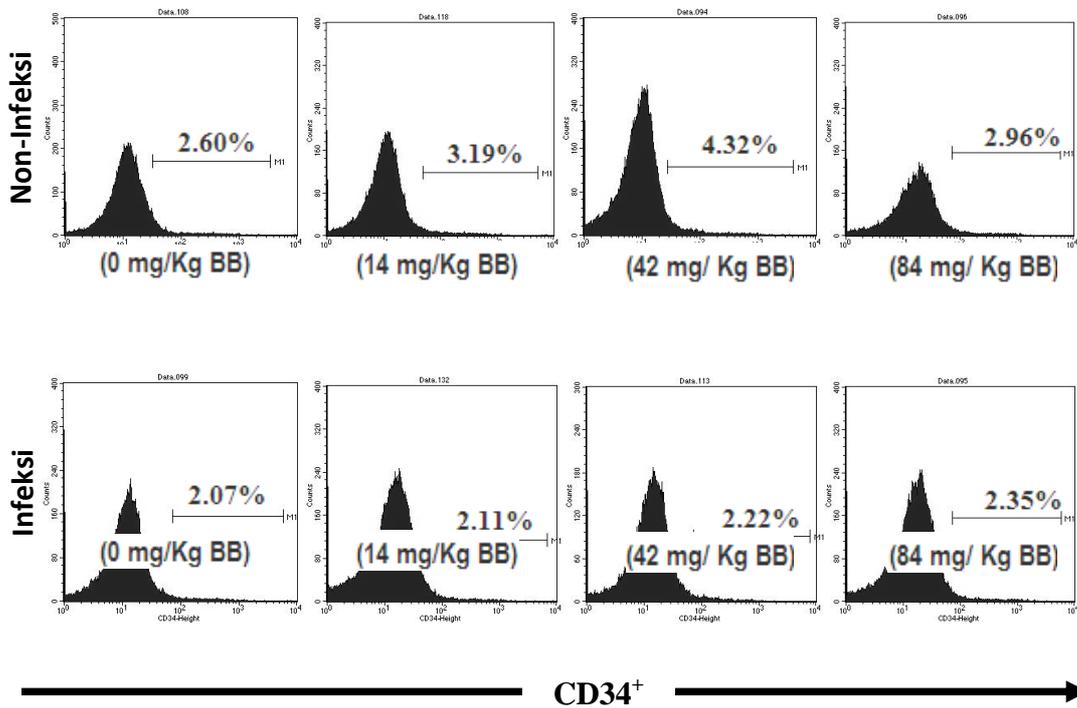
Dosis <i>M. oliefera</i>	Model Faktor Perlakuan
K (0 mg/kg BB)	<i>Non-infeksi S. typhi</i>
	<i>Infeksi S. typhi</i>
P1 (14 mg/kg BB)	<i>Non-infeksi S. typhi</i>
	<i>Infeksi S. typhi</i>
P2 (42 mg/kg BB)	<i>Non-infeksi S. typhi</i>
	<i>Infeksi S. typhi</i>
P3 (84 mg/kg BB)	<i>Non-infeksi S. typhi</i>
	<i>Infeksi S. typhi</i>

Tabel 2. Ringkasan Analisis SPSS two-way ANOVA (*Analysis of Variance*) melalui program SPSS 16.0.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>Corrected Model</i>	<i>1.896E12a</i>	7	<i>2,71E+14</i>	56.896	.000
<i>Intercept</i>	<i>9,70E+15</i>	1	<i>9,70E+15</i>	<i>2,04E+06</i>	.000
<i>DOSIS</i>	<i>4,86E+14</i>	3	<i>1,62E+14</i>	34.053	.000
<i>FAKTOR</i>	<i>8,70E+14</i>	1	<i>8,70E+14</i>	182.773	.000
<i>DOSIS * FAKTOR</i>	<i>5,39E+14</i>	3	<i>1,80E+14</i>	37.779	.000
<i>Error</i>	<i>1,14E+14</i>	24	<i>4,76E+12</i>		
<i>Total</i>	<i>1,17E+16</i>	32			
<i>Corrected Total</i>	<i>2,01E+15</i>	31			

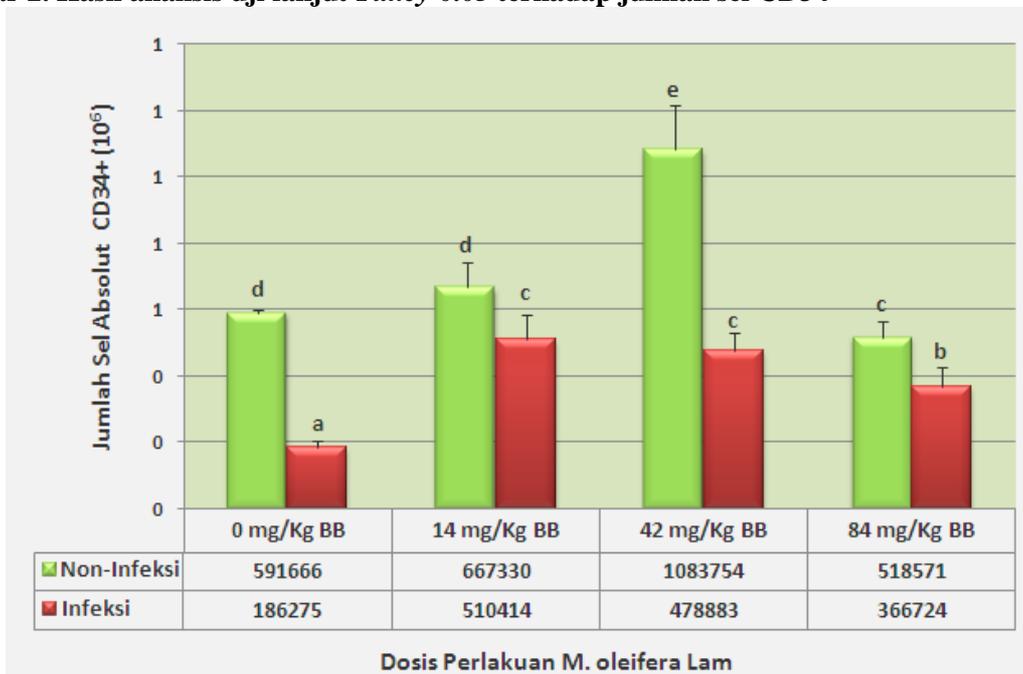
Ket: Sig < 0.05 = berbeda antara kelompok perlakuan.

Gambar 1. Hasil analisis flowcytometri sel CD34 pada bone marrow.



Gambar 1. Hasil analisis flowcytometri sel CD34⁺ pada bone marrow.

Gambar 2. Hasil analisis uji lanjut Tukey 0.05 terhadap jumlah sel CD34



Gambar 2. Hasil analisis uji lanjut Tukey 0.05 terhadap jumlah sel CD34
Keterangan: grafik yang diikuti huruf yang tidak sama menunjukkan berbeda nyata pada (P-Value 0.05).